

Institut für Pharmazie

## DISSERTATION

# **Untersuchungen zum Synergismus von Saponinen und Toxinen bei in vitro kultivierten Säugetierzellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)*

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Johann Philipp Hebestreit

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, Ph.D.

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. F. Melzig  
2. PD Dr. K. Jenett-Siems

eingereicht: 15.07.2004

Datum der Promotion: 10.12.2004

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	ARBEITSHYPOTHESEN .....	11
1.2	MEMBRANFLUSS (ENDO- UND EXOZYTOTOSE) .....	12
1.2.1	<i>Rezeptorvermittelte Endozytose .....</i>	<i>13</i>
1.2.2	<i>Endozytose durch Caveolae .....</i>	<i>14</i>
1.3	INTRAZELLULÄRER TRANSPORT VON PROTEINEN .....	16
1.4	ZELLZYKLUS UND APOPTOSE .....	17
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1	ALLGEMEINE HINWEISE .....	20
2.2	GERÄTE.....	20
2.2.1	<i>Zellkultur .....</i>	<i>20</i>
2.2.2	<i>Zentrifugen .....</i>	<i>21</i>
2.2.3	<i>Elektrophorese .....</i>	<i>21</i>
2.2.4	<i>Sonstige Geräte .....</i>	<i>21</i>
2.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	22
2.3.1	<i>Untersuchungsmaterial .....</i>	<i>22</i>
2.3.2	<i>Zellkultur .....</i>	<i>22</i>
2.4	CHEMIKALIEN .....	23
2.5	UNTERSUCHTE TRITERPENSAPONINE .....	25
2.5.1	<i>Bidesmoside .....</i>	<i>25</i>
2.5.2	<i>Monodesmosid.....</i>	<i>26</i>
2.5.3	<i>Aglykon.....</i>	<i>26</i>
2.6	ANTIKÖRPER .....	29
2.7	PROTEINE, TOXINE, ENZYME UND NUCLEOTIDE.....	29
2.8	SONSTIGES VERBRAUCHSMATERIAL .....	30
2.9	MATERIAL FÜR DIE CHROMATOGRAPHIE .....	31
2.10	REAGENZIENSÄTZE UND MOLEKULARGEWICHTSMARKER .....	31
2.11	ZELLINIEN.....	31
2.12	PUFFERLÖSUNGEN .....	32
2.12.1	<i>Puffer zur Gelelektrophorese .....</i>	<i>32</i>
2.13	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	32
2.13.1	<i>Anforderungen der Zellen an das Milieu .....</i>	<i>32</i>
2.13.2	<i>Passagieren der Zellen.....</i>	<i>33</i>
2.13.3	<i>Kultivierung von ECV 304-Zellen.....</i>	<i>33</i>
2.13.4	<i>Kultivierung von SK-N-SH-Zellen.....</i>	<i>33</i>
2.13.5	<i>Kultivierung von HaCat-Zellen.....</i>	<i>33</i>
2.13.6	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen .....</i>	<i>34</i>
2.13.7	<i>Hämatoxylin-Färbung von Zellkulturen.....</i>	<i>34</i>
2.14	IMMUNOLOGISCHE METHODEN .....	34
2.14.1	<i>Immunfluoreszenzmikroskopie .....</i>	<i>34</i>
2.14.2	<i>Immunodiffusion nach Ouchterlony.....</i>	<i>37</i>
2.15	PROTEINCHEMISCHE METHODEN .....	38

2.15.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	38
2.15.2	Zentrifugationsgetriebene Molekülsiebfiltration.....	39
2.15.3	Dialyse von Proteinlösungen .....	39
2.15.4	Lyophilisierung von Proteinlösungen .....	39
2.15.5	Proteinfällungen.....	40
2.15.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	40
2.16	FLUORESZENZMIKROSKOPIE MIT ALEXA FLUOR 488-MARKIERTEM AGROSTIN .....	44
2.17	TOXINSPEZIFISCHE METHODEN.....	45
2.17.1	Toxizitätsassays.....	45
2.17.2	Proteolytische Spaltung von Diphtheriatoxin .....	48
2.17.3	Isolierung der eingesetzten Toxine und ihrer Spaltprodukte .....	49
2.17.4	Isolierung der aktiven Domäne (DTA) des Diphtheriatoxins .....	49
2.17.5	Isolierung der enzymatisch aktiven A-Kette (RTA) von Ricin.....	52
2.18	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN.....	52
2.18.1	Gelfiltrationschromatographie.....	52
2.18.2	Kationenaustauschchromatographie .....	53
2.18.3	Dünnschichtchromatographie.....	53
2.18.4	Isolation von Agrostemmasaponin-Rohsaponingemischen.....	54
2.18.5	Isolierung der Hauptkomponenten von Saponinum album .....	55
2.18.6	Identifizierung von Gypsogenin durch saure Hydrolyse.....	55
2.19	BIOPHYSIKALISCHE METHODEN.....	55
2.19.1	Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS).....	55
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	57
3.1	AUSWAHL GEEIGNETER ZELLINIEN .....	57
3.1.1	ECV 304 (hauptsächlich verwendete Zelllinie; ATCC Nr. ACC 310) .....	57
3.1.2	HaCat (für den Amidoschwarz-Assay verwendete Zelllinie) .....	58
3.1.3	SK-N-SH (Vergleichszelllinie für ECV 304, ATCC Nr. HTB 11).....	58
3.2	ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS .....	58
3.2.1	Bestimmung der Inkubationszeit .....	58
3.2.2	Definition der Zelldichte .....	59
3.2.3	Einfluss der Zelllinie .....	59
3.3	EINFLUSS VON DMSO AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT .....	60
3.4	ZYTOTOXIZITÄT VON AGROSTEMMA-ROHEXTRAKTEN .....	61
3.5	ISOLIERUNG AKTIVER AGROSTEMMA-FRAKTIONEN .....	62
3.5.1	Fraktionierung durch Größenausschluss-Membranfiltration.....	62
3.5.2	Proteinfraktionierung durch Ammoniumsulfatfällung.....	63
3.5.3	Proteinisolierung durch Gelfiltrationschromatographie .....	63
3.6	ZYTOTOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN AN ISOLATIONSPRODUKTEN AUS AGROSTEMMA.....	66
3.6.1	Ermittlung der IC <sub>50</sub> von Saponinum album.....	66
3.6.2	Bestimmung der Zytotoxizität von Saponinen bei konstanter Agrostinkonzentration .....	67
3.6.3	Zytotoxizitätsuntersuchung von Agrostin mit unterschiedlichen Saponinen....	68
3.7	UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT DER WIRKUNG VON AGROSTIN UND SAPONIN .....	70
3.7.1	Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus an HaCat-Zellen .....	70

3.7.2	<i>Vergleich der Zytotoxizität von Agrostin an ECV 304- und SK-N-SH-Zellen</i>	71
3.7.3	<i>Getriggerte Toxizität</i>	72
3.8	STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN UNTERSCHIEDLICHER TRITERPENSAPONINE IN KOMBINATION MIT RIPS	73
3.8.1	<i>Zytotoxizitätsuntersuchung mit Gypsogenin</i>	74
3.9	VERSUCHE ZUR HEMMUNG DER TOXIZITÄT VON SAPONIN UND AGROSTIN	80
3.9.1	<i>Einfluss von Neuraminidase und EGTA auf den toxischen Effekt</i>	80
3.9.2	<i>Temperaturabhängigkeit des getriggerten toxischen Effektes</i>	82
3.9.3	<i>Untersuchung der Wirkung von unterschiedlichen Zuckern auf die Zytotoxizität von Agrostin und Saponin</i>	83
3.9.4	<i>Untersuchung des Effektes von Latrunculin A auf die Toxizität von Agrostin und Saponin</i>	85
3.10	UNTERSUCHUNG ZUR DIREKTEN CHEMISCHEN WECHSELWIRKUNG VON SAPONIN UND AGROSTIN/ HSA	86
3.11	UNTERSUCHUNGEN UNTERSCHIEDLICHER TOXINE IN KOMBINATION MIT GYPSOPHILASAPONIN	88
3.11.1	<i>Zytotoxizität von Proteintoxinen in Kombination mit Saponin</i>	92
3.12	IMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPIE	96
3.12.1	<i>Immunfluoreszenzfärbung</i>	96
3.13	ECIS-UNTERSUCHUNGEN	100
4	SCHLUSSFOLGERUNG	106
5	ZUSAMMENFASSUNG	109
6	LITERATURVERZEICHNIS	111

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
analyt.	analytisch
Ara	Arabinose
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bicinchoninsäure
Bradford-RG	Coomassie Brilliantblau G-Reagenz
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Elektrizitätsmenge (Coulomb; 1 C = 1 As)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlormethan
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
C <sub>0</sub>	Anfangskonzentration
kDa	(Kilo) Dalton [g/mol]
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DT	Diphtheriatoxin
DTA	enzymatisch aktive A-Kette von Diphtheriatoxin
E	Extinktion
ECIS	Electric Cell-Substrate Impedance Sensing
ED 50	<i>Dosis effectiva</i> ; Dosis, bei der die Hälfte des Maximaleffektes erreicht wird
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
F	elektrische Kapazität (Farad)
FAS	Tumornekrosefaktor (APO-1/CD95)
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FMP	Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin
FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatography
Fuc	Fucose
g	Gravitationskonstante
Gal	Galaktose
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HMW	High Molecular Weight
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography)
HSA	Humanserumalbumin
IC 50	Extraktkonzentration, die 50% Hemmung hervorruft
Int.	Intensität
ISCOM	Immune-Stimulating Complex
K	Kontrolle
KG	Kieselgel 60
KHz	Frequenz (Kilohertz)
konz.	konzentriert
$\lambda$	<i>Lambda</i> , Wellenlänge
$\lambda_{\text{max}}$	UV-Absorptionsmaximum
LD 50	<i>Dosis letalis</i> ; Extraktkonzentration, die 50% der Zellen abtötet
LDL	Low Density Lipoprotein
LMW	Low Molecular Weight

M	(mol/l)
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
präp.	präparativ
MeOH	Methanol
MPLC	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (Medium Pressure Liquid Chromatography)
M <sub>r</sub>	relative Molmasse
MTT	Thiazolylblau (4,5-Dimethylthiazplyl-2-)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NaCl	Natriumchlorid
n-BuOH	n-Butanol
n.b.	nicht bestimmt
n.i.	no inhibition
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffer Solution
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydronium-Ionen Konzentration
% (v/v)	Prozentgehalt Volumen am Gesamtvolumen (ml/100ml)
% (w/v)	Prozentgehalt Masse am Gesamtvolumen (g/100 ml)
rel.	relativ
R	elektrischer Widerstand
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor (ratio to front)
Rha	Rhamnose
RIP	ribosomeninaktivierendes Protein
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RP	Reversed Phase
RT	Ricin, Ricintoxin
RTA	enzymatisch aktive A-Kette von Ricin
S	Sedimentationskonstante (gemessen in Svedberg-Einheiten)

Sap	Saponin
SC	Säulenchromatographie
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
vis	visuell
Xyl	Xylose

Als Dezimaltrennzeichen wird ein Punkt verwendet.



# 1 Einleitung

Ein wichtiger Bestandteil der Evolution und ein probates Mittel in der Natur ist die Verwendung von Chemikalien zur Verteidigung oder als Angriffswaffen. Gifte finden sich in fast allen Klassen von Organismen, von Bakterien bis zu Säugetieren. Im Hinblick auf ihre chemischen Strukturen als auch auf ihre biologischen Wirkungen ist die Varianz der natürlichen Gifte besonders groß. Pflanzliche Toxine können neben dem Fraßschutz auch zur Abwehr von Mikroorganismen dienen. Eine Einteilung nach dem Wirkort ist kaum möglich, da die Giftwirkung häufig durch ein komplexes Gemisch unterschiedlicher Inhaltsstoffe verursacht wird. Bisher wurden synergistische Wirkungsverstärkungen mehrerer Inhaltsstoffe zumeist den tierischen Giften zugeschrieben. Besonders nach der von Paracelsus (1493-1514) erhobenen Forderung, die Wirkstoffe von Arzneipflanzen zu isolieren, wurde eine Vielzahl toxischer Naturstoffe isoliert: im Jahre 1772 die Oxalsäure aus dem Sauerklee (*Oxalis acetosella* L.); 1846 das Capsaicin aus dem Cayenne-Pfeffer (*Capsicum annuum* L.), 1867 das Digitoxin aus dem roten Fingerhut (*Digitalis purpurea* L.); 1887 das Ephedrin aus *Ephedra*-Arten, 1896 das Muscarin aus dem Roten Fliegenpilz (*Amanita muscaria* [L. ex Fr.] Hooker), 1937 die Phallotoxine aus dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides* [Vaill.] Secr.) und 1961 die Aflatoxine aus dem Schimmelpilz *Aspergillus flavus*, auch bekannt als „Fluch der Pharaonen“.

Das erste isolierte Triterpensaponin war die Glycyrrhizinsäure, die bereits 1809 aus der Wurzel des Süßholzes, *Glycyrrhiza glabra* L., erhalten wurde. Digitonin, ein Steroidsaponin, wurde erstmals 1875 aus den Samen des Roten Fingerhutes (*Digitalis purpurea* L.) gewonnen. Zu den bekanntesten Beispielen toxischer Saponinpflanzen gehören die Kermesbeere (*Phytolacca americana* L.) und die Kornrade (*Agrostemma githago* L.) (Teuscher & Lindequist, 1994). Obwohl Saponine schlecht resorbiert werden, kann es durch lokale Schleimhautreizungen zu einer Erhöhung der Mukosapermeabilität kommen. Nach systemischer Applikation wirken Saponine in erster Linie hämolytisch.

Der Begriff Toxin wurde ursprünglich für filtrierbare (subzelluläre) Stoffe benutzt, die Krankheiten auslösen. Als erstes wurde Diphtheriatoxin als ein von Bakterien produziertes Gift erkannt (E. Roux & A. Yersin, Institute Pasteur 1888). Heute sind hunderte Toxine bekannt, deren Gemeinsamkeit die tödliche Wirkung auf lebende Zellen ist. Alle schädigen Zellmembranen bzw. ihre Komponenten oder überwinden deren Schutzfunktion, um im Zellinneren Schaden anzurichten. Aufgrund ihrer komplexen Proteinstruktur haben sie spezifische Wirkorte. Sie können in einige Gruppen eingeteilt werden: porinähnliche Toxine

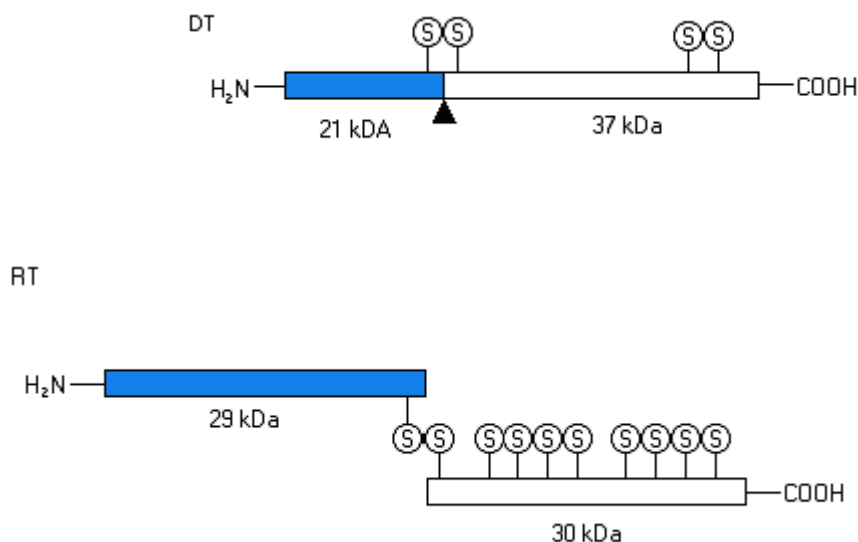
permeabilisieren Zellmembranen, so dass der Ionenhaushalt der betroffenen Zellen gestört wird und sie Nährstoffe und Energieträger verliert; Toxine mit intrazellulärem Wirkort bilden in der Zellmembran Strukturen (Kanäle) aus, die die Einschleusung einer enzymatisch wirksamen Komponente erlauben, welche ihrerseits Zellfunktionen ausschalten; eine weitere Gruppe bindet an oder modifiziert vorhandene Ionenkanäle und stört damit z. B. Reizleitungen. Auch Bacteriocine (bei *E. coli*: Colicine) gehören funktionell zu den Toxinen, sie dienen der Bekämpfung der Bakterien untereinander und wirken hochspezifisch (Pappenheimer, 1937; Lindgren, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit, deren Gegenstand die Wechselwirkung unterschiedlicher Naturstoffe hinsichtlich ihrer Toxizität ist, sind neben den Saponinen insbesondere zwei Toxintypen interessant, die auf ähnliche Weise mit der Zellmembran interagieren (Griffiths et al., 1994): A-B Toxine und Lectine.

**A-B Toxine** sind aus zwei Komponenten aufgebaut: eine bindende Domäne B sorgt dafür, dass eine enzymatisch aktive A-Domäne in die Zielzelle transportiert wird (siehe Abb. 1-1). Die aktive Domäne wird zur Freisetzung ins Zellinnere von dem Gesamtprotein abgespalten oder es handelt sich von vornherein um separate Proteine. Zu den A-B Toxinen gehören z. B. folgende bekannte Toxine: Diphtheriatoxin modifiziert eine seltene Aminosäure (Diphtamid) im Elongationsfaktor 2 und blockiert damit die Proteinsynthese; Cholera- und Pertussis-Toxin adenylieren ein Regulationsprotein der Adenylatcyclase. Shigella-Toxin und pflanzliche Toxine wie Ricin, Abrin, Nigrin b, Saporin und Agrostin sind N-Glykosidasen (ribosomeninaktivierende Proteine, RIPs), die eine essentielle Base (Adenin-4324) der ribosomalen 28S rRNA abspalten (Barbieri et al., 1997). Bakterielle Toxine entfalten im Inneren der Zielzelle eine enzymatische Aktivität. Für den Eintritt solcher Toxine in die Zielzelle spielt der Transport durch Membranen eine wichtige Rolle. Dies gilt z.B. für Cholera-, Diphtherie- und Anthrax-Toxin (D'Silva & Lala, 2000). Dabei benötigt das Toxin immer die Hilfe anderer Proteine oder Polysaccharide, die auf bisher nicht verstandene Art und Weise die Aufnahme in die Zielzelle erleichtern. Für diese Art des Proteintransports ist keine direkte Kopplung an einen energieverbrauchenden Transporter nötig. Damit unterscheidet sie sich sehr stark vom üblichen, weitgehend energieabhängigen Proteintransport. Entweder sind es die genannten Toxine selbst, welche den Transport durch die Membran hindurch bewirken, oder es sind andere Proteine, die dem Toxin beim Durchdringen der Membran helfen und die vom Bakterium entweder zusammen mit dem Toxin oder separat abgegeben werden. Beispiele für die erste Möglichkeit sind das Cholera- und das Diphtherie-Toxin (Abb. 1-1): hier ist es die so genannte Primärsequenz des

Toxinmoleküls, die den Transport bewerkstelligt (Brooke et al., 1998). Sie kann währenddessen enzymatisch abgespalten werden oder auch erhalten bleiben. Im zweiten Fall geben die Bakterien nicht nur das Toxin (A-Kette), sondern zusätzlich noch ein so genanntes Bindeprotein (B-Kette) ab. Beispiel hierfür ist das C2-Toxin von *Clostridium botulinum*, welches das Zytoskelett seiner Zielzellen zerstört. RIPs wie Agrostin und Saporin besitzen keine zellbindende Domäne und werden als sog. Typ I RIPs klassifiziert (Barbieri et al., 1993).

**Lectine** (Typ II-RIPs) wie das Ricin aus *Ricinus communis* L. sind zuckerbindende A-B Toxine mit der Eigenschaft, Zellen zu agglutinieren und/ oder Glykokonjugate (Polysaccharide, Glykoprotein, Glykolipide u.a.) zu präzipitieren. Diese heterogene Proteinklasse unterscheidet sich insbesondere strukturell von Immunglobulinen (Antikörper), die auch Zuckerstrukturen binden können.

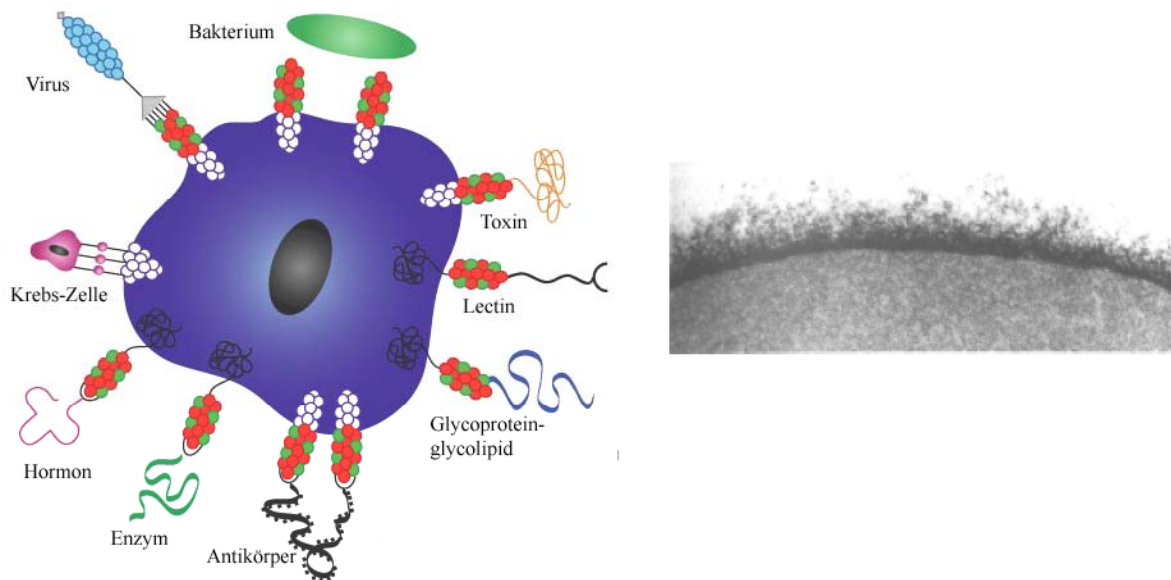


**Abb. 1-1:** Schematische Darstellung der Proteintoxine von Diphtheriatoxin (DT) und Ricin (RT). Wie Agrostin und Saporin sind RT und DT ebenfalls durch eine A-B-Struktur gekennzeichnet. Die blauen Abschnitte stellen die katalytisch aktive Domäne (A-Kette) dar. Die restlichen Abschnitte vermitteln die Zielerkennung und die Rezeptorbindung. Die Toxine sind so dargestellt, wie sie aus den entsprechenden Herkunftsorganismen isoliert werden können. RT liegt bereits getrennt in A- und B-Kette vor, während bei DT durch das Dreieck die Position der physiologischen Spaltstelle gekennzeichnet ist. Nach der Spaltung (siehe auch 2.17.4) werden die beiden Polypeptidketten jeweils über die der Spaltstelle benachbarte Disulfidbrücke zusammengehalten. Weiterhin sind die für derartige Proteine typischen Disulfidbrücken dargestellt (Keller & Fuchs, 2002; Umata & Mekada, 1998).

Die Fähigkeit von pflanzlichen Lectinen an Zucker zu binden und Aggregation zu induzieren ist schon seit Jahrhunderten bekannt. Da sie ursprünglich nur aus Pflanzenextrakten isoliert worden sind und zur Agglutination von Blutzellen (Erythrozyten) eingesetzt wurden, sprach

man zunächst von Phytohaemagglutininen. Später stellte es sich heraus, dass sie auch aus tierischen Organen (vornehmlich der Invertebraten) zu gewinnen sind und dass keineswegs alle an Erythrozyten binden. W. C. Boyd und E. Slapeigh führten daher 1954 den Begriff Lectin (lat.: legere = auswählen) ein. Lectine besitzen mindestens zwei Zuckerbindungsstellen, sonst wäre ihr Agglutinations-/Präzipitationsvermögen nicht erklärbar. In der Tat bestehen die meisten von ihnen aus zwei, vier oder mehr meist gleichartigen Untereinheiten. Ihre Spezifität wird durch jenes Mono- oder Oligosaccharid definiert, welches das Agglutinationsvermögen kompetitiv inhibiert. Die Affinität eines Lectins zu Zellen oder Makromolekülen (Liganden) liegt um Größenordnungen über der zu einzelnen Zuckern. Daraus wurde geschlossen, dass es bei der Bindung der Liganden nicht nur auf die Kohlenhydratanteile ankommt, sondern dass zusätzliche, unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen (schwache Bindungen) den Komplex stabilisieren. Man kennt beispielsweise eine Reihe von Lectinen, z. B. RCA (*Ricinus communis* L. Agglutinin), PNA (Peanut, bzw. *Arachis hypogaea* L. Agglutinin) oder SBA (Sojabohnen-, bzw. *Glycine max* [L.] Merr.-Agglutinin) mit einer Affinität zu  $\beta$ -D-Galaktosylresten, doch findet man deutliche Unterschiede in ihrem Bindungsvermögen zu bestimmten Zellen oder Glykoproteinen (Olsnes, 1987). Einen großen Einfluss übt die sterische Lage der Kohlenhydrate an der Molekül- oder Zelloberfläche aus; sie müssen für das Lectin zugänglich sein (Abb. 1-2). Wegen der strukturellen Komplexität der Liganden werden die lectinbindenden Moleküle üblicherweise als Lectinrezeptoren bezeichnet. Trotz gewisser Unsicherheiten bezüglich ihrer chemischen Charakterisierung wurden Lectine in den letzten Jahrzehnten in steigendem Umfang in der medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt (Frankel et al., 2000), denn sie eignen sich, um bestimmte Zelltypen oder Zellfragmente (z. B. Membrantypen) zu charakterisieren, Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erkennen, normale von Tumorzellen zu unterscheiden, die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu markieren und verschiedene Zelltypen affinitätschromatographisch voneinander zu trennen. Viele der Lectine sind intrazellulär lokalisiert, zum Teil kommen sie dort in beträchtlichen Mengen vor, doch welche Bedeutung ihnen zukommt, ist weitgehend unbekannt. Sie reagieren mit Speicherproteinen, wobei die Affinität zum arteigenen Speicherprotein weit höher ist als zu einem artfremden. Hieraus wurde geschlossen, dass sie die Proteine komplexieren und sie so in eine kompakte unlösliche Form überführen, in der sie in der Zelle besser lagerfähig sind als in gelöstem Zustand (Basha & Roberts, 1981). Viele Lectine sind toxisch und bieten der Pflanze möglicherweise einen Schutz vor Fressfeinden. Zum Beispiel wirkt das kaum toxische Lectin der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) auf den Käfer *Callosobruchus maculatus* F. letal.

Das *Ricinus communis* L. Agglutinin (RCA) enthält eine für alle Tiere und den Menschen hochgiftige Komponente, das Ricin (Katzin et al., 1991). Im Experiment mit tierischen Zellen wurde gezeigt, dass einige Lectine in geringen Konzentrationen zellteilungsfördernd wirken; daher auch die Bezeichnung Mitogene. Inwieweit das für die Pflanzen von Bedeutung ist, bleibt zu klären.



**Abb. 1-2:** links: Auf der Oberfläche der Zelle lokalisierte Zucker. Abb. rechts: rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Glykokalix), die in der kohlehydrat-assoziierten Zielerkennung und Rezeptorbindung z. B. von Lectinen eine Rolle spielen (<http://wong.scripps.edu>).

**Saponine** sind eine im Pflanzenreich weit verbreitete Naturstoffgruppe, die wegen ihrer physikalisch-chemischen sowie physiologischen Eigenschaften in einer Gruppe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe zusammengefasst werden. Saponine sind häufig bitter schmeckende, oberflächenaktive, glykosidische Verbindungen, die durch saure oder enzymatische Hydrolyse in Sapogenine und Zucker gespalten werden. Die Aglyka bestehen aus einem Steroid- oder Triterpenteil, dem so genannten Sapogenin, wobei die Mehrzahl der Saponine eine Triterpenstruktur besitzt (Tab. 2-1). An das Aglykon sind verschiedene Zuckermoleküle gebunden, die aus Ketten mehrerer Monosaccharide (meistens D-Glucose, D-Galaktose, D-Fucose, L-Rhamnose, D-Xylose, L-Arabinose und D-Glucuronsäure) bestehen können. Der Zuckerrest ist an einer Position (monodesmosidische Saponine) oder über zwei Positionen (meist am C<sub>3</sub> und am C<sub>28</sub>: bisdesmosidische Saponine) glykosidisch/ verestert an das Aglykon

gebunden. Die Anwesenheit polarer (Zucker) und unpolarer (Steroide oder Triterpene) Gruppen bedingt die starke Oberflächenaktivität der Saponine. Für die meisten pflanzlichen Lebensmittel liegt der Saponingehalt im Bereich von 0,1–1,0 % der Trockenmasse. Ihre Bedeutung als Waschmittel in früheren Zeiten zeigt der vom lateinischen *sapo* = Seife stammende Begriff. Die Toxizität für Fische, eine charakteristische Eigenschaft der Saponine, ergibt sich aus ihrer Eigenschaft, die Permeabilität des Kiemenepithels zu erhöhen und kleinmolekulare Bestandteile aus dem Blut auszuwaschen.

Viele Saponindrogen werden als Phytopharmaka verwendet, z. B. als Expektorantien (*Primulae radix*, *Hedera helix folium*, *Polygalae radix*), Antiexsudativa (*Hippocastani semen*), Tonika (*Ginseng radix*), Immunadjuvantien (*Quillajae cortex*) und Diuretika (*Herniariae herba*) (Bader, 1994). Innerhalb der Europäischen Gemeinschaft sind saponinreiche Extrakte aus der Rinde des Panama- oder Seifenrindebaumes (*Quillaja saponaria* Mol.) als Lebensmittelzusatzstoffe (E999) zugelassen und werden u. a. als Schaum-bildner eingesetzt. Die Rinde dieses Baumes enthält bis zu 5 % Saponine. In Deutschland sind Quillaja-Extrakte als Zusatzstoff für alkoholfreie, aromatisierte Erfrischungsgetränke auf Wasserbasis zugelassen (200 mg/l wasserfreier Extrakt).

Oral aufgenommene Saponine werden durch saure Hydrolyse, intestinale Enzyme sowie im Dickdarm durch die Mikroflora in Zucker und Sapogenine gespalten (Price et al., 1987). Das absorbierte Aglykon wird an Serumalbumin gebunden transportiert und durch Bindung an Glucuronsäure in eine wasserlösliche, leicht über die Nieren ausscheidbare Form umgewandelt. Die physiologischen Wirkungen der Saponine stehen in direktem Zusammenhang mit ihrer individuellen chemischen Struktur (Lacaille-Dubois, 2000). Antibiotische Wirkungen von Saponinen richten sich in erster Linie gegen Pilze. Die antifungale Wirkung wird über eine Komplexbildung von Saponinen mit Sterinen der Pilzmembran erklärt (Francis et al., 2002). Durch Zugabe von Cholesterol lässt sich diese Wirkung aufheben, da Saponine mit Cholesterol komplexieren (Allayee et al., 2000). Diese Beobachtung führte zu eingehenden Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung von Saponinen auf biologische Membranen (Bangham & Horne, 1962; Glaueri et al., 1962; Gogelein & Huby, 1984). Aufgrund der ausgeprägten Affinität zu Cholesterol werden Saponine auch therapeutisch zur Senkung des Cholesterinspiegels verwendet.

Die immunologischen Wirkungen der Saponine können in zwei Gruppen eingeteilt werden, eine Adjuvans- sowie eine immunstimulierende Wirkung (Plohmann et al., 1997).

Die Adjuvans-Wirkung der Saponine wurde bereits zu Beginn der 50er Jahre festgestellt und findet heute in Veterinärvakzinen als ISCOM (Immune stimulating Complex) Verwendung

(Barr et al., 1998). Werden Antigene in Kombination mit Saponinen verabreicht, so kommt es zu einer stärkeren Immunantwort gegen das Antigen als ohne Saponine (Kensil, 1996). Saponine als Adjuvantien erhöhen die Antikörperbildung und induzieren bei T-Lymphozyten antikörperspezifische Gedächtniszellen und die Lymphozytenproliferation sowie die B- und T-Zellen-Kooperation bei der Antikörperbildung (Behboudi et al., 1997). Experimentell wurde bereits eine verstärkte saponinvermittelte Adjuvanswirkung einer antigenspezifischen Immunantwort auf HIV-1 Impfstoffe festgestellt (Wu et al., 1992). Die immunstimulierende Wirkung von Saponinen und saponinreichen Extrakten ist in vitro in zahlreichen Experimenten belegt worden (Bomford et al., 1992).

Die Toxizität ist häufig nicht mit hochgereinigten Saponinen ermittelt worden, sondern mit ungereinigten Extrakten. Daher liegen wenige Informationen zur Toxizität einzelner Saponine vor. Die Toxizität zahlreicher Pflanzen, zu denen z. B. die Kornrade (*Agrostemma githago* L.), die Kermesbeere (*Phytolacca americana* L.) und das Alpenveilchen (*Cyclamen europaeum* L.) zu rechnen sind, wird in der Literatur den Triterpensaponinen zugeschrieben, obwohl bis heute kaum Studien existieren, die sich mit dem Zusammenhang zwischen der gastrointestinalen Absorption und der Toxizität der Saponine befassen. Bei oraler Saponinaufnahme wird für Warmblüter eine LD<sub>50</sub> von 50–1000 mg/kg Körpergewicht angegeben, was als niedrig einzuschätzen ist. Einzelne Saponine besitzen in vitro und nach intravenöser Applikation eine starke hämolytische Wirkung (Zerstörung der Erythrozytenzellmembran mit anschließendem Hämoglobin-Austritt), weshalb Saponine lange generell als toxisch bezeichnet wurden. Allerdings besteht kein Zusammenhang zwischen der Hämolyseaktivität und einer therapeutischen Wirksamkeit (Lacaille-Dubois & Wagner, 2000). Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit besteht nur ein sehr geringes Risiko, dass es beim Menschen durch den Verzehr saponinreicher Lebensmittel zur Hämolyse kommen könnte. Unklar ist jedoch bis heute, inwieweit im Intestinaltrakt vorhandene Nährstoffe, sekundäre Pflanzenstoffe oder Toxine in Anwesenheit von Saponinen vermehrt absorbiert werden (Tschesche & Wulff, 1973).

Ein bisher kaum untersuchter, ehemals heimischer Vertreter der Giftpflanzen ist die Kornrade, *Agrostemma githago* L.. In der vorliegenden Arbeit wurde der Samen der Kornrade, in der sowohl ein AB-Toxin, das Agrostin, als auch ein Triterpensaponingemisch enthalten sind, *in vitro*-toxikologisch untersucht.

Im Jahr 1837 traten in Frankreich Intoxikationen von Hühnern auf, die sich durch kornradehaltiges Futter vergifteten (Lewin, 1928). Erst massiv auftretende Intoxikationen im russischen Heer führten Ende des 19. Jahrhunderts dazu, dass die Kornrade toxikologisch

untersucht wurde (Kruskal, 1891). Auf der Grundlage dieser Arbeit wurde schließlich ein neuer Grenzwert für den Gehalt von Kornradesamen im Mehl festgelegt. Insbesondere im chemischen- und pharmakologischen Teil der Dissertationsarbeit von Nikolai Kruskal finden sich Hinweise darüber, dass schon im 19. Jahrhundert nach tierexperimentellen Versuchen nicht klar war, ob das reine Saponin das toxische Prinzip des Kornradesamens darstelle. Diesbezüglich wird R. Böhm zitiert: „...*Die Verunreinigungen des Kornrade-Saponins riefen dagegen bedeutende Verlangsamung der Herzbewegung, sowie nach Verlauf einer Stunde Lähmung und Tod des Frosches hervor*“. Noch konkreter, wenn auch sicherlich unbewusst, wird durch folgendes Zitat aus dieser Arbeit auf die eigentlich toxische Substanz im Samen hingewiesen: „*Lehmann und Mori gelang es nun durch Rösten des Mehles, ohne jeden Zusatz, ....die Samen vollkommen ungiftig zu machen*“. Mit dem heutigen Wissen über die Inhaltsstoffe und die Thermolabilität des Proteins Agrostin liegt der Schluss nahe, dass das toxische Protein (als Bestandteil der o.a. „Verunreinigung“) durch das Rösten denaturiert und dadurch das Samenmaterial entgiftet wurde (Hebestreit et al., 2003). Durch Saatgutverunreinigung entstandene Vergiftungen traten immer wieder auf, bis Ende des 19. Jahrhunderts im Zuge des modernen Ackerbaus die maschinelle Saatgutreinigung Einzug fand. So wurden speziell zum Aussieben der Kornradesamen sogenannte „Radenfänger“ oder „Ausreuter“ entwickelt, die schließlich zur vollständigen Ausrottung dieses ehemaligen Getreideunkrautes und damit auch zum Ende des öffentlichen Interesses an dieser ehemals weltweit verbreiteten Pflanze führten.

Die Kornrade gehört seit dem 16. Jahrhundert zum Arzneischatz: Im *New Kreüterbuch* von Leonhart Fuchs aus dem Jahr 1543 findet man sowohl eine Abbildung der Pflanze, als auch Angaben über ihre medizinische Verwendung (Hebestreit et al., 2003). Im Jahr 1753 erhielt die Kornrade (Abb. 1-3), eine Caryophyllacee, von Carl von Linnæus den Gattungsnamen *Agrostemma*. Vermutlich sind im Namen *Agrostemma githago* L. var. *githago* die griechischen Begriffe *agros* = *Acker* und *stemma* = *Kranz, Krone* miteinander verknüpft. Dieser heute nur noch selten zu findende Archäophyt war ehemals ein weit verbreitetes Getreideunkraut, das schon vor Hippokrates bekannt war und medizinisch verwendet wurde (Hoffmann-Bohm, 1992). Der deutsche Name, der den Begriff „Rad“ enthält, deutet auf die Form der oberen Teile der fünf Kronblätter hin, die an ein Wagenrad erinnern. Allerdings werden mit der Bezeichnung *Rade* (althd.: *ratan*) auch andere Ackerunkräuter belegt, wie z. B. *Lolium temulentum* L. oder *Nigella arvensis* L. (Marzell, 1943). Die Kornrade gehört zur sog. Ackerbegleitflora und war bis in die sechziger Jahre neben vielen anderen Wildkräutern eine häufig auftretende Pflanze im Wintergetreide. Ihr Vorkommen erstreckte sich von Süd-



und Mitteleuropa bis nach Asien. Ihre größte Verbreitung bis nach Nord- und Südamerika, Afrika und Australien erlangte sie mit Beginn des Getreideanbaus. Durch die moderne Ackerbautechnik, maschinelle Saatgutreinigung und den Gebrauch von Herbiziden ist die Kornrade heute entweder ausgestorben oder zählt zu den stark gefährdeten Arten, sog. "Rote-Liste-Arten". Besondere Popularität erlangte sie erst wieder, als man erkannte, dass kornradehaltiges Mehl verantwortlich für aufgetretene Intoxikationen war. Dementsprechend groß wurde das Interesse an Untersuchungen zur Ursache dieser Toxizität, deren Symptome zunächst anhand vieler Tierversuche beschrieben wurden (Kruskal, 1891). Seit dem 19. Jahrhundert wird in Anlehnung an bekannte, toxische Saponine von einem „Sapotoxin“ gesprochen, das für die Toxizität verantwortlich gemacht wird (Lewin, 1928). Als das Problem der Intoxikation durch Kornradesamen mit der nahezu vollständigen Ausrottung der Pflanze uninteressant geworden war, verlor man auch das naturwissenschaftliche Interesse, das toxische Prinzip der Kornrade weiter zu erforschen und hielt sich weiterhin daran, dass ein toxisches Saponin oder ein Gemisch verschiedener derartiger Saponine im Samen der Kornrade verantwortlich für ihre hohe Toxizität seien (Lewin, 1928). Auch der im reifen Samen gefundenen, seltenen Aminosäure Orcylalanin wurde die Toxizität zugeschrieben; diese Hypothese erwies sich jedoch ebenfalls als falsch (Blöcher, 1982). Sehr unterschiedliche Symptome und Empfindlichkeiten zeigten verschiedene Tierarten nach dem Verzehr des Samens (Hoffmann-Bohm, 1992). Beim Menschen wird die nach chronischer Anwendung auftretende Symptomatik als Githagismus bezeichnet, dem Githagosid entsprechend, welches als Hauptsaponin der Pflanze angesehen wird.

Die bekannten Inhaltsstoffe der Kornradesamen sind insbesondere bidesmosidische Triterpensaponine diverser Struktur (siehe Tab. 2-1). Bis heute sind aus dem Samen der Kornrade drei Triterpensaponine mit Gypsogenin (= Githagenin,  $3\beta$ -Hydroxy-23-oxo- $\Delta^{12}$ -oleanen-28-Säure) als Aglykon isoliert worden: ein monodesmosidisches Tetraglykosid (= Githagosid) und die Agrostemmasaponine 1 und 2, beides Bidesmoside des Gypsogenins (Tschesche & Schulze, 1974; Siepmann et al., 1998). Als Nebensaponinaglykon ist auch Quillajasäure ( $3\beta$ , 16  $\alpha$ -Dihydroxy-23-oxo- $\Delta^{12}$ -oleanen-28-Säure) zu finden (Hoffmann-Bohm, 1992). Neben den erwähnten Saponinen sind weitere Inhaltsstoffe der reifen Samen 0,4 % Orcylalanin (2,4-Dihydroxy-6-methylphenylalanin), ca. 6 % fettes Öl und das ribosomeninaktivierende Protein (RIP 1) Agrostin mit einer rel. Molekülmasse ( $M_r$ ) von 27 kDa (De Klerk & Engelen, 1985). Aussagen über das toxische Prinzip waren bisher zumeist spekulativ und stützten sich auf ein „Sapotoxin“, ein toxisches, im Samen enthaltenes Saponin bzw. eine hohe Konzentration der vermeintlich toxischen Saponine. Ende der neunziger Jahre

untersuchten Siepmann et al. den Gesamtsaponingehalt des Samenmaterials, welcher wesentlich geringer als der in der Literatur angegebene Wert von 5-7 % [m/m] ausfiel (Siepmann et al., 1998). Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse sowie der erheblich höheren Toxizität des wässrigen Samenextraktes im Vergleich mit dem methanolisch-wässrigen Extrakt und der *Agrostemma*-Saponine (siehe Abb. 3-1) wurde im Rahmen einer Diplomarbeit der wässrige Extrakt neben den Saponinen hinsichtlich potentiell toxischer Saponine und Proteine (RIPs), die vermutlich für die Pflanze einen Abwehrmechanismus gegen Viren und andere Pathogene darstellen, untersucht (Barbieri et al., 1993).



**Abb. 1-3:** Abbildung der Kornrade (*Agrostemma githago* L.) und des Kornradesamens (Abb. links: Köhlers Atlas der Medicinalpflanzen).

Mit der Isolierung der Saponine der Kornradesamen beschäftigten sich Siepmann et al. an der Humboldt-Universität in Berlin (Siepmann et al., 1998). Anschließend wurden Zytotoxizitätsuntersuchungen der isolierten Agrostemmasaponine im Verhältnis zu Rohextrakten von Kornradesamen durchgeführt (Hebestreit, 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeiten deuten erstmals darauf hin, dass das toxische Prinzip im Samen der Kornrade nicht allein auf deren Saponine zurückgeführt werden kann, da die Toxizitätswerte des wässrigen Gesamtexttraktes sowohl die des methanolisch-wässrigen Gesamtexttraktes als auch die entsprechende Konzentration der darin enthaltenen Saponine in seiner Toxizität weit übertreffen (Hebestreit & Melzig, 2003).

## 1.1 Arbeitshypothesen

Bis heute wurden aus den Samen von *Agrostemma githago* L. var. *githago* drei Saponine mit dem Aglykon Gypsogenin (=Githagenin, 3 $\beta$ -hydroxy-23-oxo- $\Delta$ 12-oleanen-28-säure) als Hauptsapogenin und Quillajasäure (3 $\beta$ , 16 $\alpha$ -Dihydroxy-23-oxo- $\Delta$ 12-oleanen-28-säure) als Nebensapogenin isoliert: Githagosid, ein monodesmosidisches Tetraglykosid (Tschesche & Schulze, 1974) und die Agrostemmasaponine 1 und 2, beides 3, 28-Bisdesdesmoside mit Gypsogenin als Aglykon (Siepmann et al., 1998). Entsprechend der bereits untersuchten Agrostemma-Extrakte wurde die These einer kooperativen Toxizität zwischen Saponinen und Toxinen wie dem Agrostin aufgestellt (Hebestreit & Melzig, 2003). Insbesondere wurden Triterpensaponine aus Caryophyllaceen untersucht (siehe Tab. 2-1) und in subtoxischen Konzentrationen eingesetzt, die in vitro eine Proliferationsförderung auslösen (Abb. 3-8). Die meisten der eingesetzten Toxine waren funktionell oder strukturell verwandt mit dem Agrostin. Es war die Aufgabe dieser Dissertation, die zur Aktivität notwendigen Einzelkomponenten und ihren Wirkungsmechanismus zu charakterisieren.

Daraus ergaben sich die folgenden Arbeitsaufgaben:

- Um kombinatorische Zytotoxizitätsuntersuchungen durchführen zu können, musste das Agrostin aus dem Samenmaterial isoliert werden (Abschnitt 3.5).
- Weitere verwandte Saponine und das Aglykon Gypsogenin wurden systematischen Zytotoxizitätsuntersuchungen unterzogen und hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehung untersucht.

- Ein Agrostin-Antiserum und ein FITC-markierter Anti-Antikörper dienen der intrazellulären immunfluoreszenzmikroskopischen Darstellung, mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs AlexaFluor488 wurde das Agrostin direkt markiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abschnitt 2.16 und 3.12).
- Weitere synergistisch wirkende Toxine mit Agrostin-ähnlichen Eigenschaften sind untersucht worden, um Analogien hinsichtlich der Wirkung der Kombination Saponin-Toxin zu ermitteln (siehe Abb. 3-19).
- Durch eine gezielte Manipulierung der Endozytoseaktivität sollten Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus gezogen werden (Abschnitt 3.9).
- Biophysikalische Messungen mit Hilfe der ECIS-Methode sollten es ermöglichen, die Kinetik des Toxinaufnahmemechanismus besser charakterisieren zu können (Abschnitt 3.13).

Zum Verständnis eines möglichen Toxinaufnahmemechanismus ist es erforderlich, den Membranfluss einer Zelle darzustellen:

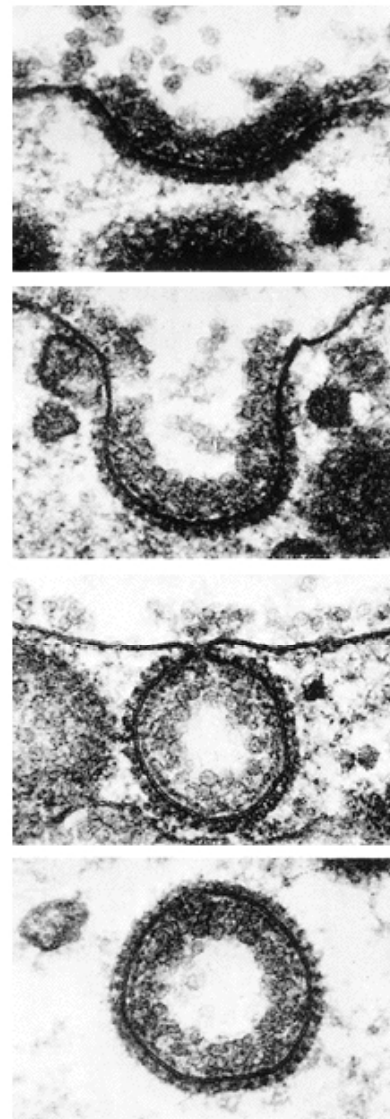
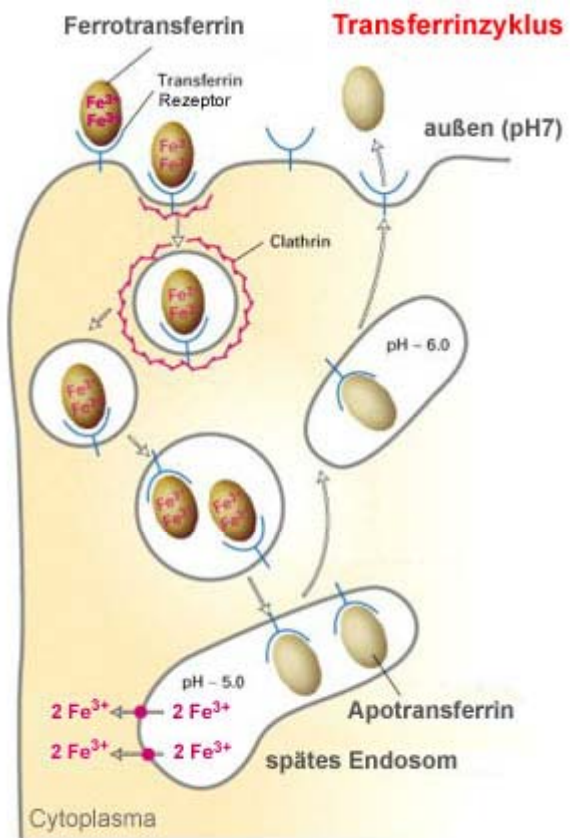
## 1.2 Membranfluss (Endo- und Exozytose)

Nach der Kompartimentierungsregel kann man die Endozytose als Aufnahme von extrazellulärem Raum interpretieren, der durch aktive Vorgänge der Zelle so verändert wird, dass er von der Zelle „kontrolliert“ werden kann. Die Aufnahme erfolgt durch Abschnürung der Zellmembran in das Zytoplasma. Ursprünglich wurde der Prozess in die Aufnahme ganzer Partikel (Phagozytose, von griech. *phagein* = fressen) und die Aufnahme von Flüssigkeit (Pinozytose von griech. *pinein* = trinken) unterteilt. Es wird angenommen, dass der Vorgang der Endozytose evolutionär aus dem Nahrungsaufnahmemechanismus in frühen einzelligen Organismen entstanden ist. Die Funktion der Endozytose hat sich jedoch im Lauf der Entwicklung zu höheren Lebewesen immer mehr spezialisiert und nur in bestimmten Fällen dient sie noch der Internalisierung von Substanzen mit Nahrungscharakter, wie z.B. bei der Endozytose von Transferrin zur Aufnahme von Eisen (siehe Abb. 1-4), oder bei der LDL-Endozytose zur Rekrutierung von Cholesterin (Allayee et al., 2000; Simons & Ikonen, 2000). Die Aufnahme der meisten Nährstoffe erfolgt bei Säugetierzellen durch transmembranen Transport von niedermolekularen energiereichen Verbindungen aus dem Blut bzw. dem Extrazellularraum. Der Endozytosemechanismus als Methode zur Nahrungsaufnahme wurde

mit der Zeit von den Zellen für verschiedenste Aufgaben adaptiert, z. B. für die Interaktion mit anderen Zellen, für Immunreaktionen, zur Regulation zellulärer Prozesse über Wachstumshormone, zur Eliminierung körperfremder Zellen oder zum Abbau extrazellulärer Makromoleküle. Die Zelle benötigt diesen besonderen Mechanismus, um große, hydrophile Moleküle wie Proteine, die sie nicht auf klassische Weise durch Diffusion, Membranporen oder Ionenkanäle aufzunehmen bzw. auszuscheiden vermag, durch die Zellmembran zu transportieren (Haines, 1994). Dabei umfließt die Membran das Material und schließt sich zu einem Bläschen (Vesikel), das nun durch die Zellen diffundiert. Allgemein entstehen bei der Endozytose Vesikel (membranhüllte Bläschen), die man Endosomen nennt. Auf die gleiche Weise, nur umgekehrt, werden Stoffe auch aus der Zelle ausgeschieden. Hier spricht man von Exozytose (exo = hinaus). Bei all diesen Vorgängen sind das ER, der Golgi-Apparat und die Lysosomen beteiligt.

### 1.2.1 Rezeptorvermittelte Endozytose

Ein Beispiel für eine rezeptorvermittelte Endozytose ist der Transferrinzyklus (Abb. 1-4). Dabei werden in wachsenden Zellen durch ein Transportprotein (= Transferrin) Eisen  $\text{III}^+$ -Ionen in die Zelle transportiert. Bei niedrigem pH im Endosom entlädt das Eisentransportprotein die Eisenionen ins Zytoplasma und diffundiert wieder an die Zelloberfläche, wo es durch Exozytose ausgeschleust wird (Ippoliti et al., 1995). Bei der rezeptorvermittelten Endozytose wird Klathrin in die Membran eingelagert und ein „coated pit“ (= ummantelte Grube) gebildet (Abb. 1-4). Klathrinbedeckte Vesikel vermitteln den selektiven Transport von Transmembranproteinen (z.B. M6P-Rezeptor aus dem trans-Golgi-Netz) und befördern lösliche Moleküle, die an die Rezeptoren gebunden sind oder sich im Vesikellumen befinden. Klathrin besteht aus drei großen und drei kleinen Polypeptidketten, die zusammen eine dreibeinige Struktur, das Triskelion, bilden. Diese Klathrin-Triskelions lagern sich zu einem käfigähnlichen, konvexen Netz aus Fünf- und Sechsecken zusammen, die auf der Membranoberfläche die coated pits bilden. Ein weiteres wichtiges Hüllprotein in diesen Vesikeln ist das Adaptin. Es wird benötigt, um den Klathrinbelag an die Membran zu binden und Transmembran-Rezeptorproteine zu greifen, die wiederum dazu dienen, bestimmte Frachtmoleküle selektiv in die Vesikel aufzunehmen.



**Abb. 1-4:** Beispiel einer rezeptorvermittelten Endo- und Exozytose: der Transferrinzyklus (Abb. links aus: <http://www.egbeck.de>). Dieser Mechanismus spielt bei der Aufnahme von Cholesterol (LDL), Hormonen (Insulin), Toxinen (Diphtheriatoxin), Antikörper (IgG) eine bedeutende Rolle. In der rechten Abbildung wird elektronenmikroskopisch die Bildung eines Clathrin-umhüllten Vesikels dargestellt.

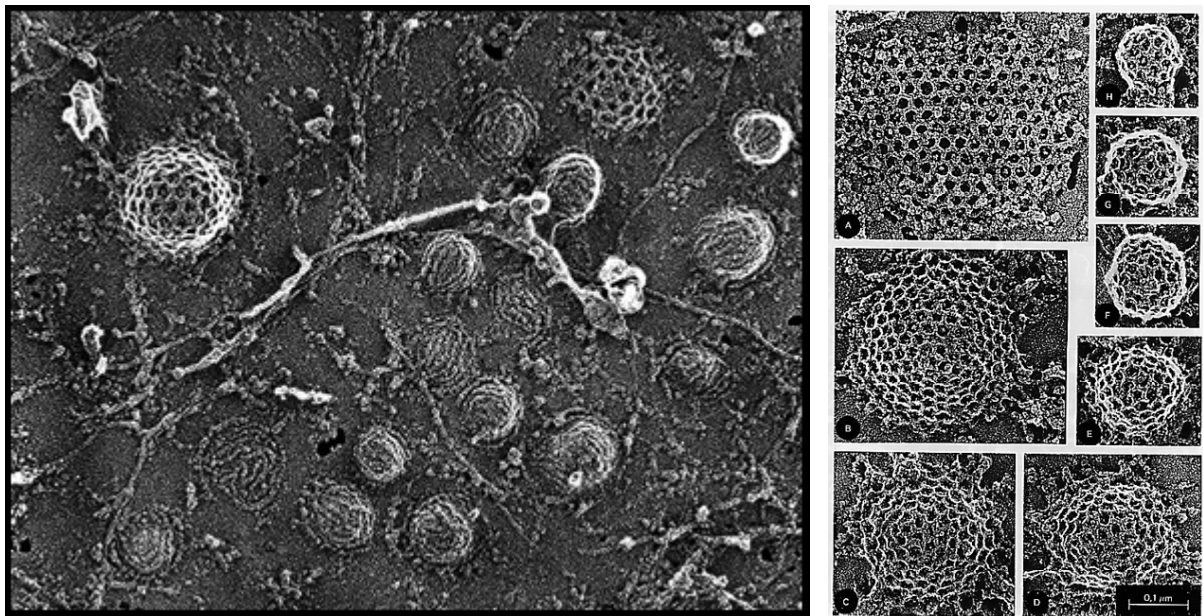
(Abb. links: <http://www.sp.uconn.edu>; Abb. rechts: Copyright 2002: Thomas M. Terry).

### 1.2.2 Endozytose durch Caveolae

Bei dieser Art der Endozytose handelt es sich um einen Clathrin-unabhängigen, Ligand-getriggerten Energie- und temperaturabhängigen Transport. Caveolen (lat. Caveolae - engl. caveols) sind kurze, tubulusartige Einstülpungen in die äußere Membran von Zellen und



werden auch als eine spezielle Form der „lipid rafts“ definiert. Lipid rafts, auch als „Caveolae intracellulares“ bezeichnet, werden seit 1988 kontrovers diskutiert (Pelkmans & Helenius, 2002). Caveolae sind dicht gepackte, Cholesterol- und glycosphingolipidreiche Abschnitte höherer Ordnung, die oft nur einige hundert Nanometer in das Zellinnere hinein reichen. Sie werden experimentell durch ihre Unlöslichkeit in nichtionischen Detergenzien wie Triton X-100 charakterisiert (Shogomori & Brown, 2003). Die Caveolae verlaufen dabei typischerweise parallel zur Außenmembran in 30-50 nm Abstand zu dieser. Sie erinnern an mikropinozytotische Bläschen, obwohl sie keinen für endozytotische Bläschen typischen Klathrinmantel aufweisen. Möglicherweise stehen die morphologisch an ein glattes endoplasmatisches Retikulum erinnernden Caveolae mit Zisternen des Golgi-Apparates in Verbindung.



**Abb. 1-5:** links: Elektronenmikroskopische Abbildung der Innenseite eines Fibroblasten. Die Caveolen sind typischerweise kleiner als „Clathrin-coated pits“ und machen mehr als 10 % der Membranoberfläche von Endothelzellen aus (siehe Abb. links oben). Die spiralen-förmige Struktur der Caveolen entsteht durch Zusammenlagerung von Caveolin, einem Membranprotein mit einer Molmasse von 22 kDa; rechts: Entstehung eines „coated pit“. (Abb. aus <http://www.heuserlab.wustl.edu>; John Heuser, Washington University).

Neben ihrer Rolle in der Signalübertragung und der Transzytose spielen die Caveolen vermutlich auch eine Rolle im Transport zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER, in der Potozytose, einem speziellen endozytotischen Mechanismus zur Aufnahme kleinerer Moleküle, sowie in der Cholesterol-Homöostase der Zelle. Im Gegensatz zur Klathrin-vermittelten Endozytose, z. B. Transferrin, das bereits nach 15 min internalisiert wird, läuft

die Endozytose durch Caveolae (z. B. Choleratoxin) wesentlich langsamer (10-20 h) ab. Caveolen sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Neuere Arbeiten belegen, dass Caveolen eine entscheidende Rolle bei der getriggerten Internalisierung von Membrankomponenten, extrazellulären Liganden, Toxinen und verschiedenen Viren spielen und zur Aktivierung ein komplexer Aktivierungsprozess von Nöten ist (Fittipaldi, 2003).

### 1.3 Intrazellulärer Transport von Proteinen

Wege für den Proteintransport:

- Transport durch Poren (die selektiv sein können) (Haines, 1994)
- Transport durch Membranen (durch Translokatoren) (Schatz & Dobberstein, 1996)
- Transport über Vesikel (durch Abschnüren und Verschmelzen) (Kirchhausen, 2000)

Transport durch die Kernmembran: Die Kernporenkomplexe bestehen aus ca. 100 Proteinen und haben eine Größe von 125000 kD. Ein Zellkern besitzt in Abhängigkeit von der Transkriptionsaktivität 3000-4000 Poren. Kernproteine werden im Zytosol von freien Ribosomen synthetisiert. Wasserlösliche Moleküle mit weniger als 5 kD können frei passieren. Das kritische Molekulargewicht, das offenbar nicht mehr passieren kann, liegt bei 60 kD ( $M_r$  Agrostin: 27 kDa,  $M_r$  Ricin: 64 kDa), der Kanal ist 9 nm im Durchmesser und 15 nm lang. Größere Proteine, wie die aggregierten ribosomalen Proteinkomplexe, werden aktiv transportiert.

**Proteintransport: Cytosol → Kern:** Die Proteine (Fracht) binden dabei über die Lys-Reste an das zytosolische Transportprotein Importin  $\alpha$ . Nach Bindung von Importin  $\beta$  dockt der Komplex an die Kernpore an und wird unter Vermittlung und Kontrolle des RanGDP-Proteins durch die Pore geschleust. Durch Bindung eines RanGTP-Proteins im Kern an Importin  $\beta$  wird der trimere Komplex gespalten und das Fracht-Protein frei.

**Proteintransport: Kern → Cytosol:** Die Frachtproteine werden durch Bindung an Transportproteine Exportin, Karyopherin, Transportin gebunden und unter Beteiligung von RanGTP aus dem Kern transportiert.

**Protein-Import in das ER (Signalhypothese):** Dieser Transport erfolgt kotranslational. Ein SRP (vom engl.: signal recognition particle) bindet an das hydrophobe Signal des neu synthetisierten Proteins und inseriert es an den Rezeptor (SRP-Rezeptor) im ER. Da das ganze noch am Ribosom hängt, entstehen so die Polysomen. Es besteht ein wässriger Kanal



unterhalb des SRP-Rezeptors, der in Abwesenheit des Ribosoms verschlossen ist. Das N-terminale Signal verbleibt an der Pore und wird erst von der Signalpeptidase abgeschnitten, wenn das C-terminale Ende im ER ist. Durch Ausknospung von ER-Membranen entstehen Vesikel, in denen sich der ER-Inhalt (mit Protein) befindet. Die abgeschnürten Vesikel gelangen zum Golgi-Apparat und fusionieren mit der Membran der Golgi-Hohlräume (cis-Zisterne). Damit ergießt sich der Vesikelinhalt in den Zisterneninhalt. Durch Vesikeltransport gelangen die Proteine in die medianen- und trans-Zisternen, in denen sich die Modifizierung der KH-Kette durch aufeinander folgende Anlagerung von Monosacchariden (Fucose, N-Acetylglucosamin, Galaktose, Sialinsäure) fortsetzt. Dadurch entstehen die Signale für den Transport in verschiedene Zellkompartimente bzw. für die Sekretion. Proteine, bei denen die Phosphorylierung der Mannose der KH-Ketten stattfindet, binden in den trans-Zisternen an ein Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Protein, wodurch sie in die Lysosomen dirigiert werden. Durch Knospung können "leere" Rezeptorproteine wieder zurück zur Membran transportiert werden (Rezeptor-Recycling). Der endozytotische und der sekretorische Weg sind miteinander verbunden. Das Transportprinzip ist der vesikuläre Transport. Lysosomen können mit Endosomen (von der Endozytose), mit Autophagosomen und mit Phagosomen fusionieren. Ein weiterer Weg des vesikulären Transportes ist die Exozytose (siehe Abb. 1-4).

## 1.4 Zellzyklus und Apoptose

Um den Angriffsort von toxischen Lectinen definieren zu können, gibt der folgende Abschnitt einen Überblick über die wichtigsten Schritte der Zelldifferenzierung, der Proteinsynthese und den sog. „programmierten Zelltod“: die Apoptose.

G0-Phase: die meisten ausdifferenzierten Zellen befinden sich in der G0-Phase, d.h. sie teilen sich nicht mehr, wie z. B. Neuronen oder Zellen der Augenlinse, sie haben den Zellzyklus verlassen. Zellen können aus der G0-Phase durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren in die G1-Phase übergehen.

G1-Phase: G für gap = Lücke, postmitotische Ruhephase, dauert bei einer sich rasch teilenden menschlichen Zelle (wie z.B. Epithelien) rund 4-10 Stunden. Biochemisch ist sie durch RNA- und Proteinsynthese sowie durch Größenzunahme der Zelle gekennzeichnet. Synthese von Histonen, Enzymen, die in der S-Phase zur Replikation/ Transkription benötigt werden.

S-Phase: (Synthese-Phase), ca. 8 Stunden, in ihr findet die Synthese von DNA, RNA, Enzymen (Replikation) statt, Bildung des Zentrosoms.

G2-Phase: prämitotische Ruhephase ca. 12 Stunden; es werden die Proteine für die Mitose synthetisiert. Hier wird kontrolliert, ob die gesamte DNA repliziert ist, ansonsten verharrt die Zelle in G2 und tritt nicht in die Mitose ein. G1, S, G2 werden als Interphase zusammengefasst. In dieser Phase greifen RPs wie Agrostatin in den Zellzyklus ein. Der wichtigste Schritt der Proteinbiosynthese, welche durch RPs unterbunden wird, ist der Translationsmechanismus: die Initiation erfordert die Assoziation der Ribosomenuntereinheiten. Die mRNA bindet mit einer spezifischen Bindungsstelle an das Ribosom, sie enthält das Startcodon AUG (codiert Methionin). Weiterhin enthält der Initiationskomplex die Starter-tRNA (Methionyl-tRNA<sub>f</sub>), GTP und mindestens 6 Initiationsfaktoren (eIF, eukaryontischer Initiations-Faktor). Die an der Starter-tRNA gebundene Aminosäure Methionin ist formyliert (N<sup>10</sup>Formyl-FH<sub>4</sub>). Damit ist die NH<sub>2</sub>-Gruppe blockiert, wodurch die Richtung der Protein-Synthese festgelegt ist. EF-2 unterscheidet z. B. zwischen normaler Met-tRNA<sub>m</sub> und Starter-Methionyl-tRNA<sub>f</sub>. Diese bindet am Peptidyl-Zentrum auf dem Ribosom. An einer mRNA können mehrere Ribosomen arbeiten (Polysomen). Bei der Elongation wird die nächste, mit der AS beladene tRNA an die dem P-Zentrum benachbarte noch freie Aminoacylbindungsstelle (A-Zentrum) gebunden (Codon-Anticodon-Wechselwirkung). Hierfür ist der Elongationsfaktor EF-1α notwendig. Die Transpeptidase katalysiert die Knüpfung der Peptidbindung zwischen der NH<sub>2</sub>-Gruppe der im A-Zentrum sitzenden Aminoacyl-tRNA und der COOH-Gruppe der im P-Zentrum gebundenen Formyl-Methionyl-tRNA<sub>f</sub>. Die nun nicht mehr beladene Methionin-spezifische tRNA<sub>f</sub> dissoziiert ab. Anschließend erfolgt die Translokation der Peptidyl-tRNA (mit der mRNA) aus dem A-Zentrum in das P-Zentrum mit Hilfe von EF2. Die Termination erfolgt beim Erreichen eines Stopcodons. Ein Releasingfaktor setzt GTP-abhängig das Protein frei (eRF). Durch eine ADP-Ribosylierung (Inaktivierung) von EF2 hemmt z. B. Diphtheriatoxin den Translationsmechanismus (siehe Abschnitt 3.11; Nurse, 2000).

**Apoptose** (programmierter Zelltod): Die Zellzahl eines Organs wird durch Proliferation und Zelluntergang reguliert. Die Notwendigkeit einer solchen Regulation besteht in der Entwicklungs- und Umbauphase von Geweben. So ist die Apoptose auch für das Gleichgewicht im Immunsystem notwendig, z. B. für die Selbsttoleranz.

Apoptose ist die häufigste Form von Zelltod im Organismus. Sie wird durch folgende biochemische und zellbiologische Charakteristika morphologisch definiert (Lincz, 1998):

- Verlust der Stabilität der Plasmamembran, Ausstülpungen (Zeiose)

- Abschnüren von membranumschlossenen Vesikeln (Blebbing)
- Verlust der Membranasymmetrie (Exposition von Phosphatidylserin nach außen)
- Schrumpfen des Kerns, Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung durch Wirkung von Endonukleasen zwischen den Nukleosomen
- apoptotische Zellen, bzw. deren Überreste, werden von Makrophagen (CD14-Rezeptor) phagozytiert; daher keine Entzündungsreaktion
- Vakuolisierung des Zytoplasmas

**Apoptose-auslösende Faktoren** sind z. B. Signale von außen: Fas-Ligand, Tumor-nekrosefaktor (TNF, Viren, RIPs und Immunotoxine, oxidativer Stress, etc. (Bolognesi et al., 1996; Utsumi et al., 1991). Die Zytokine binden an Rezeptoren, die eine sog. Todesdomäne besitzen. Die Bindung des Liganden induziert häufig eine Trimerisierung des Rezeptors, was dann intrazellulär eine Kaskade von Effekten auslöst. Der am besten untersuchte Rezeptor ist das Molekül CD95.

Der Unterschied zur **Nekrose** besteht in Folgendem:

- bei der Nekrose schwellen Zellen an und platzen
- der Zellinhalt incl. Zellorganellen wird demzufolge nach außen abgegeben
- dem folgt wiederum eine Entzündungsreaktion
- die Nekrose ist im Gegensatz zur Apoptose nicht energieabhängig

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Allgemeine Hinweise**

In der Arbeit verwendete, geschützte Warenzeichen werden nicht als solche gekennzeichnet. Eine fehlende Kennzeichnung bedeutet folglich nicht, dass ein entsprechender Produktname frei von Rechten Dritter ist. Alle Puffer und Lösungen werden- falls nicht anders angegeben- mit bidestilliertem Wasser aus einer Destillationsanlage hergestellt. Die verwendeten Materialien für die Zellkultur und für die molekularbiologischen Methoden sind entweder vom Hersteller steril verpackte Einmalartikel oder sie werden vor ihrer Verwendung in einem Autoklaven bei 121°C 20 min dampfsterilisiert. Sofern bei einigen der folgenden Methoden und Inkubationsschritte keine Temperatur angegeben wird, so wird bei Raumtemperatur gearbeitet.

### **2.2 Geräte**

#### **2.2.1 Zellkultur**

- Begasungsbrutschrank Cellstar; Nunc Intermed GmbH, Wiesbaden
- CASY-Zellzählgerät; Schärfe System GmbH, Reutlingen
- Gasbrenner Schütt Flamy S; Schütt GmbH, Göttingen
- Lichtmikroskop TMS-F; Nikon, Japan
- Mikroplattenphotometer Tecan Spectra Fluor; Tecan, Österreich
- Rundschüttler, SLT Shaker; Elmech GmbH, Celle
- SLT-Mikrotiterplattenreader; SLT Labinstrument, Wien
- Sterile Laminar-Flow-Box Herasafe; Heraeus-Christ, Hanau
- Temperierbad IKA TS2; IKA Labortechnik, Staufen i. Brg.
- Temperierplatte Präzitherm; Störk-tronic GmbH, Stuttgart
- Vakuumpumpe Vacusafe; Integra Biosciences, Schweiz
- Werkbank Clean Air CLF 360; Woerden, NL

### 2.2.2 Zentrifugen

- Kühltzentrifuge; Heraeus-Christ, Hanau
- Tischzentrifuge Biofuge pico; Heraeus-Christ, Hanau
- Tischzentrifuge Medifuge 200 S; H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
- Ultrazentrifuge Optima L 90 K; Beckman-Coulter, München

### 2.2.3 Elektrophorese

- Netzgerät PowerPac 1000 Power Supply, 220/240 V; Bio-Rad, München
- Thermokonvektions-Geltrockner Gel Air 230 V, 50 Hz; Bio-Rad, München
- Vertikal-2-D-Elektrophoresesystem Mini Protean II; Bio-Rad, München

### 2.2.4 Sonstige Geräte

- Analysenwaage AC 210 D; Sartorius, Göttingen
- DC-Auftragegerät Linomat IV; Camag, Schweiz
- Digitalkamera für Fluoreszenzmikroskop DXM1200; Nikon, Japan
- ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) ELS 1000; Polymer Laboratories, UK
- Fluoreszenzmikroskop BX 41; Olympus, Japan
- FPLC-Anlage; Pharmacia Biotech, Schweden
- Gefriertrockner Christ Alpha 2-4; Christ, Aichach
- Heizbäder B-480/ 485; Büchi AG, Schweiz
- HPLC-Anlage LC-10; Shimadzu, Japan
- HPLC-Fraktionssammler FR 10 A; Shimadzu, Japan
- Impedanzmessungsgerät SI-1260; Solartron Instruments, Farnborough, UK
- Magnetrührer Ikamag RCT; Janke & Kunkel GmbH, Staufen i. Brg.
- MPLC-Anlage; Büchi AG, Schweiz
- MPLC-Fraktionssammler; Büchi AG, Schweiz

- pH-Meter CG 817-T; Schott Geräte, Hofheim
- Trockenschrank WTB; Binder, Tutlingen
- Ultraschallbad Sonorex RK 100; Bandelin Electronic, Berlin
- UV/VIS-Spektralphotometer UV-2101 PC; Shimadzu, Japan
- UV-Lampe UV-Kabinett II; CAMAG, Schweiz
- Vakuum-Rotationsverdampfer Rotavapor RE-111/ RE-121/ EL-131; Büchi AG, Schweiz
- Vortex Genie II; Scientific Industries, USA
- Wasserbäder 1002-1013, GFL, Burgwedel

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

### 2.3.1 Untersuchungsmaterial

Das Samenmaterial der Kornrade, *Agrostemma githago* L. var. *githago*, hat die Sortiments-Nr. „AGRO 26/80“ der Genbank in Gatersleben. Es wurde an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Quedlinburg kultiviert. Die in Mitteleuropa ehemals verbreiteten Sippen der Kornrade sind tetraploid mit  $2n = 4x = 48$  Chromosomen.

### 2.3.2 Zellkultur

- 96 Well Masterblock, 2 ml; Greiner bio-one, Frickenhausen
- 96/ 24/ 6-Well-Tissue Culture Plate; Greiner bio-one, Frickenhausen
- Casy Clean Lösung; Schärfe System GmbH, Reutlingen
- Casy Ton Lösung; Schärfe System GmbH, Reutlingen
- Centrifuge Tubes 15/ 50 ml, sterile; Corning Inc., USA
- Einmal-Injektionskanülen Gr. 1, Sterican; B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Einmal-Sterilfilter Minisart; Sartorius, Göttingen
- Fetales Kälberserum (FCS); Biochrom KG, Berlin
- Flüssigkeitsreservoirs steril 55 ml; Carl Roth GmbH, Karlsruhe

- Gibco's Keratinocyte Serum Free Medium (RPMI 1640); Biochrom KG, Berlin
- Hämatoxylinlösung III nach Gill; Merck, Darmstadt
- Medium 199 Earle; Biochrom KG, Berlin
- MEM-Earle's; Biochrom KG, Berlin
- Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container; Nalge Nunc International, UK
- Omnifix-Einmalspritzen 1 ml/ 2 ml/ 10 ml; B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- PBS-Dulbecco-Puffer; Biochrom KG, Berlin
- Sterilfilter Minisart, Porengröße 0.2 µm; Sartorius, Göttingen
- Tissue Culture Flask 50/ 250 ml, sterile; Greiner bio-one, Frickenhausen
- Trypsin/ EDTA Solution 0.05 %/ 0.02% (w/v); Biochrom KG, Berlin

Sterile Einwegware, wie Pipetten, Schraubdeckelröhrchen, Zentrifugenröhrchen und Gefäße für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc (Wiesbaden), Roth (Wiesbaden), Merck (Darmstadt) und Greiner (Nürtingen) bezogen.

## 2.4 Chemikalien

- Aceton ( $\text{Me}_2\text{CO}$ ); Merck, Darmstadt
- Agarose; Serva, Heidelberg
- Amidoschwarz 10 B; Merck, Darmstadt
- Ammoniumsulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ); Merck, Darmstadt
- Anisaldehyd; Merck, Darmstadt
- Bariumchlorid, ( $\text{BaCl}_2$ ); Merck, Darmstadt
- Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ); Merck, Darmstadt
- Coomassie Blue G 250; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- D-Galaktose (D-Gal); Merck, Darmstadt
- D-Glucose (D-Glc); Merck, Darmstadt
- Dichlormethan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); Merck, Darmstadt

- Diethylether ( $\text{Et}_2\text{O}$ ); Merck, Darmstadt
- Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); Merck, Darmstadt
- D-Glucuronsäure (D-GlcA); Serva, Heidelberg
- D-Mannose (D-Man); Merck, Darmstadt
- DMSO (Dimethylsulfoxid); Merck, Darmstadt
- EDTA; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- EGTA; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Essigsäure ( $\text{AcOH}$ ); Merck, Darmstadt
- Ethanol ( $\text{EtOH}$ ); Merck, Darmstadt
- Ethylacetat ( $\text{EtOAc}$ ); Merck, Darmstadt
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Merck, Darmstadt
- Formaldehyd ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); Merck, Darmstadt
- Glycerol; Merck, Darmstadt
- Hämatoxylin-Lösung III nach Gill, Merck, Darmstadt
- Human-Serumalbumin; Impfstoffe Dessau
- Isopropanol; Merck, Darmstadt
- Kochsalz ( $\text{NaCl}$ ); Merck, Darmstadt
- L-Fucose (L-Fuc); Merck, Darmstadt
- Methanol ( $\text{MeOH}$ ); Merck, Darmstadt
- MTT ((4,5-Dimethylthiazpyl-2-)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid); Merck, Darmstadt
- N-Acetyl-D-galaktosamin; Sigma, Deisenhofen
- N-Acetyl-D-glucosamin; Merck, Darmstadt
- Natriumdihydrogenphosphat, ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ); Merck, Darmstadt
- n-Butanol ( $\text{n-BuOH}$ ); Merck, Darmstadt
- p-Hydroxybenzaldehyd; Merck, Darmstadt
- Petrolether; Merck, Darmstadt



- Phosphorsäure (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); Merck, Darmstadt
- Salzsäure (HCl); Merck, Darmstadt
- Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); Merck, Darmstadt
- Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure); Sigma, Deisenhofen
- β-Mercaptoethanol (2-Sulfanylethan-1-ol); Merck, Darmstadt
- Toluol; Merck, Darmstadt
- Trifluoressigsäure (TFA); Merck, Darmstadt
- Tris-Puffer, Tris (hydroxymethyl)aminomethan; Serva, Heidelberg
- Trypsin; Sigma, Deisenhofen
- Trypsininhibitor aus Sojabohnen; Sigma, Deisenhofen

Weitere Chemikalien wie z. B. NaCl wurden von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, der Merck AG (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

## 2.5 Untersuchte Triterpensaponine

### 2.5.1 Bisdesmoside

#### 2.5.1.1 Reinsubstanzen

Saponine aus *Arenaria juncea* M.Bieb. (M.A. Lacaille-Dubois, Université de Bourgogne)

Gypsophilasaponin 2 (Arj E/ Go E); (Frechet et al., 1991; Gaidi et al., 2001<sup>a</sup>)

Gypsophilasaponin 4 (Arj D); (Frechet et al., 1991; Gaidi et al., 2001<sup>a</sup>)

Junceosid A (Arj A/ Gac D); (Gaidi et al., 2001<sup>a</sup>)

Junceosid C (Arj C); (Gaidi et al., 2001<sup>a</sup>)

Saponine aus *Acanthophyllum squarrosum* Boiss. (M.A. Lacaille-Dubois, Université de Bourgogne)

Acanthophyllum-Saponin A (AsA); (Gaidi et al., 2000)

Acanthophyllum-Saponin B (AsB); (Gaidi et al., 2000)

Acanthophyllum-Saponin D (AsD); (Gaidi et al., 2001<sup>b</sup>)

Acanthophyllum-Saponin E (AsE); (Gaidi et al., 2001<sup>b</sup>)

Saponin aus *Helianthus annuus* L. (K. Hiller, G. Bader, Humboldt-Universität zu Berlin)

Helianthussaponin 2 (Helianthosid 2); HU Berlin (Hiegemann et al., 1995)

Saponine aus *Agrostemma githago* L. (C. Siepmann, G. Bader, Humboldt-Universität zu Berlin)

Agrostemmasaponin 1/ 2; Siepmann, G. Bader, HU Berlin (Siepmann et al., 1998)  
(Abbildung der Strukturformeln der Saponine: siehe Tab. 2-1)

#### 2.5.1.2 Rohsaponine und isolierte Hauptkomponenten

Saponine aus *Gypsophila paniculata* L. und *Gypsophila arrostii* L.

Saponinum album; Merck, Darmstadt (Kochetkov, 1963)

2 isolierte Hauptkomponenten von Saponinum album (HK 1; HK 2)

Saponin aus *Quillaja saponaria* Mol.

Quillajarohsaponingemisch; MA Lacaille-Dubois, Université de Bourgogne

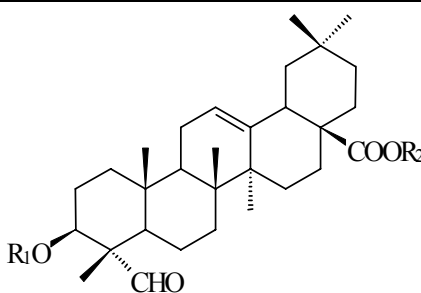
#### 2.5.2 **Monodesmosid**

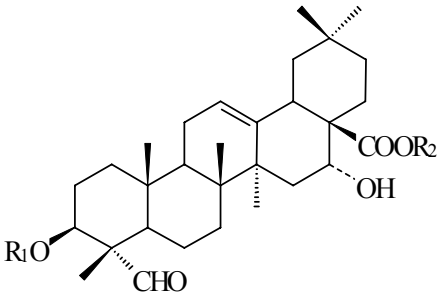
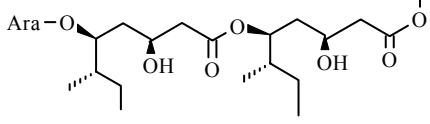
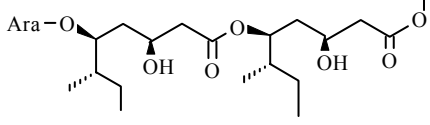
Go B; MA Lacaille-Dubois, Université de Bourgogne

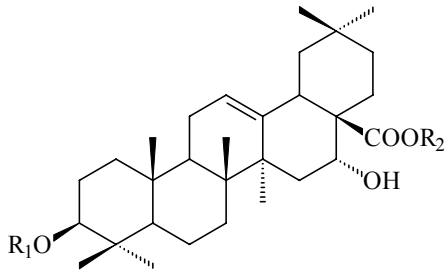
#### 2.5.3 **Aglykon**

Gypsogenin (Astrantiagenin D), Referenzsubstanz (Hiller et al., 1976)

**Tab. 2-1:** Struktur der Triterpensaponine

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="text-align: right; margin-right: 20px;"><b>Gypsogenin</b></div>  </div>		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
AsA	Gal— <sup>2</sup> GlcA— <sup>3</sup>   Xyl	Xyl— <sup>3</sup> Xyl— <sup>4</sup> Rha— <sup>3</sup> Fuc— <sup>4</sup>   Rha
AsB	Glc—	Rha— <sup>2</sup> Ara— <sup>2</sup> Glc— <sup>6</sup>   Glc
AsD	Gal— <sup>2</sup> GlcA— <sup>3</sup>   Xyl	Xyl— <sup>4</sup> Rha— <sup>2</sup> Fuc 4—OAc— <sup>3</sup>   Ara (f) 6—OAc
ArjA	Gal— <sup>2</sup> GlcA— <sup>3</sup>   Ara	Glc— <sup>3</sup> Rha— <sup>2</sup> Fuc— <sup>4</sup>   Xyl
ArjC	Gal— <sup>2</sup> GlcA— <sup>3</sup>   Xyl	Xyl— <sup>4</sup> Rha— <sup>2</sup> Fuc—
ArjD	Gal— <sup>2</sup> GlcA— <sup>3</sup>   Xyl	Glc— <sup>3</sup> Rha— <sup>2</sup> Fuc— <sup>4</sup>   Xyl
AS 1	Gal— <sup>2</sup> GlcA— <sup>3</sup>   Xyl	Glc— <sup>3</sup> Rha— <sup>2</sup> Fuc— <sup>4</sup>   OAc
AS 2	Gal— <sup>2</sup> GlcA— <sup>3</sup>   Xyl	Glc— <sup>3</sup> Rha— <sup>2</sup> Fuc— <sup>4</sup>   <sup>4</sup>   Xyl      OAc
Gypsosid	Gal— <sup>4</sup> Glc— <sup>2</sup> GlcA— <sup>3</sup>   Ara	Xyl— <sup>3</sup> Fuc— <sup>4</sup> Rha— <sup>2</sup>   Xyl <sup>3</sup>   Xyl
Gypsophilasaponin 3	Glc— <sup>2</sup> GlcA—	Xyl— <sup>3</sup> Fuc— <sup>4</sup> Rha— <sup>4</sup>   Glc

Gypsophilasaponin 4	$\begin{array}{c} \text{Xyl} - \text{GlcA} - \\   \\ \text{Gal} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Xyl} - \text{Fuc} - \text{Rha} - \\   \\ \text{Glc} \end{array}$
GoB	$\begin{array}{c} \text{Gal} - \text{GlcA} - \\   \\ \text{Xyl} \end{array}$	H-
<p>Quillajasäure (= 16 <math>\alpha</math>-Hydroxygypsogenin)</p>		
AsE	Glc—	$\begin{array}{c} \text{Rha} - \text{Ara} - \text{Glc} - \\   \\ \text{Glc} \end{array}$
ArjE	$\begin{array}{c} \text{Gal} - \text{GlcA} - \\   \\ \text{Xyl} \end{array}$	$\text{Ara} - \text{Ara} - \text{Xyl} - \text{Rha} - \text{Fuc} -$
Gypsophilasaponin 1	$\begin{array}{c} \text{Xyl} - \text{GlcA} - \\   \\ \text{Gal} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Xyl} - \text{Fuc} - \text{Rha} - \\   \\ \text{Glc} \end{array}$
Gypsophilasaponin 2	$\begin{array}{c} \text{Xyl} - \text{GlcA} - \\   \\ \text{Gal} \end{array}$	$\text{Ara} - \text{Ara} - \text{Xyl} - \text{Fuc} - \text{Rha} -$
DS 1	$\begin{array}{c} \text{Xyl} - \text{GlcA} - \\   \\ \text{Gal} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Api/Xyl} - \text{Xyl} - \text{Rha} - \text{Fuc} - \\   \quad   \\ \text{Glc} \quad \text{R} \end{array}$
QS 21	$\begin{array}{c} \text{Xyl} - \text{GlcA} - \\   \\ \text{Gal} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Api/Xyl} - \text{Xyl} - \text{Rha} - \text{Fuc} - \\   \quad   \\ \text{Glc} \quad \text{R} \end{array}$ 
QS 18	$\begin{array}{c} \text{Xyl} - \text{GlcA} - \\   \\ \text{Gal} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Api/Xyl} - \text{Xyl} - \text{Rha} - \text{Fuc} - \\   \quad   \\ \text{Glc} \quad \text{R} \end{array}$ 

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div>Echinocystsäure</div> <div>  </div> </div>		
Helianthosid 2	$\begin{array}{c} \text{Xyl} - \text{Glc} - \\   \\ \text{Rha} \end{array}$	$\text{Glc} - \text{Rha} - \text{Ara} -$

## 2.6 Antikörper

- FITC-konjugiertes Ziegen-IgG gegen Kaninchen IgG; Sigma, Deisenhofen
- Kaninchen-Antiagrostin-Antikörper; Pineda Antikörper-Service, Berlin
- Serumprobe: 1. Immunisierungstag, 5 ml (Nullserum)
- Serumprobe: 61. Immunisierungstag, 25 ml
- Serumprobe: 75. Immunisierungstag, 50 ml

## 2.7 Proteine, Toxine, Enzyme und Nucleotide

- Agrostin; Sigma, Deisenhofen
- Diphtheriatoxin; Sigma, Deisenhofen
- FAS C-terminales Tripeptid; Bachem, Heidelberg
- His-Saporin; Dr. Fuchs, Klinikum Benjamin Franklin, Berlin
- Latrunculin A; Sigma, Deisenhofen
- Microcystin-LR; Vector Laboratories Inc., USA
- Neuraminidase; Sigma, Deisenhofen
- Nigrin b; LKT Laboratories Inc., UK
- Ricin-Toxin A (RTA); Dr. Fuchs, Klinikum Benjamin Franklin, Berlin

- Saporin; Sigma, Deisenhofen
- Trypsin, TPCK-(N-(1-Chlor-4-phenylbutan-2-on-3-yl)-p-toluonsulfonsäure-) behandelt; Sigma, Deisenhofen
- Trypsininhibitor; Sigma, Deisenhofen

Zur chemischen Struktur und den Eigenschaften der Toxine, sowie pharmakologischen sowie biochemischen Erläuterungen: siehe Abschnitt 3.11.

## **2.8 Sonstiges Verbrauchsmaterial**

- Cellophanfolie Dryease Mini; Invitrogen, USA
- Dialysiermembran Spectra/Por CE (Cellulose Ester, 10 ml, MWCO.: 25000), Float-A-Lyzer; Spectrumlabs, USA
- Dialysiermembran Spectra/Por RC (Regenerated Cellulose, 3 ml, MWCO.: 15000), Float-A-Lyzer; Spectrumlabs, USA
- Dialysierschläuche (Visking), Ausschlussgrenze 12-14 kDa; Roth, Wiesbaden
- Einmalküvetten Plastibrand; Brand, Wertheim
- Einmalküvetten Plastibrand; Brand, Wertheim
- Elektrophorese-Fertiggele 10-20 % Tris-Glycin, 10 wells; Biorad, München
- Filterpapier Whatman 3 MM; Whatman International Ltd., Maidstone, UK
- Geloader Tips für SDS-PAGE (1-10 µl, autoklavierbar); Eppendorf, Hamburg
- Mikroskopische Deckgläser 18x18 mm; Assistent, Deutschland
- Molekülsiebfilter (MWCO: 5/10/30/100 kDa), low-protein-binding; Sigma, Deisenhofen
- Objektträger; Ernst Schütt, Göttingen

## 2.9 Material für die Chromatographie

- CM Cellulose-Kationenaustauscher (Carboxymethylcellulose); Sigma, Deisenhofen
- Cytochrom c zur Gelfiltrationschromatographie ( $M_r$ : 12.4 kDa); Sigma, Deisenhofen
- DC-Alufolien, Kieselgel 60, Schichtdicke 0.2 mm, 10x10 cm; Merck, Darmstadt
- DC-Alufolien, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0.2 mm, 10x10 cm; Merck, Darmstadt
- DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0.2 mm, 10x10 cm, 5x10 cm; Merck, Darmstadt
- HiLoad-Superdex 75; Pharmacia, Schweden
- Kieselgel 60 (Korngröße 0.063-0.20)
- Sephadex G 75 Superfine zur Gelfiltrationschromatographie; Pharmacia, Schweden
- Sephadex G 50 Superfine zur Gelfiltrationschromatographie; Pharmacia, Schweden

## 2.10 Reagenziensätze und Molekulargewichtsmarker

- Alexafluor 488 Protein Labeling Kit; Molecular Probes, USA
- BCA-(2,2'-Bicinchoninsäure-) Proteinbestimmungsreagens; Pierce, USA
- Cytochrom c zur Gelfiltrationschromatographie ( $M_r$ : 12.4 kDa); Sigma, Deisenhofen
- Low-Molecular-Weight-calibration-kit; Biorad, München
- Low-Molecular-Weight-calibration-kit; Pharmacia, Schweden

## 2.11 Zelllinien

- ECV-304: Sublinie der humanen Blasenkarzinom-Zelllinie T-24 mit Endotheleigenschaften (Isolat aus T-24-Linie, ATCC Nr. ACC 310)
- HaCat: Adulte humane Keratinozyten-Zelllinie (Boukamp et al., 1988)
- SK-N-SH: Humane Neuroblastom-Zelllinie aus Knochenmarksmetastasen (ATCC Nr. HTB 11)

## 2.12 Pufferlösungen

Dulbecco-PBS-Puffer	1.5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 35 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.9 mM $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4
PBS-Puffer	150 mM NaCl, 8.33 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.67 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4
Sörensen-Phosphatpuffer	150 mM NaCl, 8.3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.83 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4
Tris-HCl-Puffer	20 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7.4

### 2.12.1 Puffer zur Gelelektrophorese

Running buffer	0.4 M Tris-HCl, 0.02 M Natriumacetat, 2 mM EDTA, 0.2 % SDS, pH 8.0
Laemmli sample buffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS, pH 8.3
LMW-Kit-buffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2.5 % SDS, 5 % $\beta$ - Mercaptoethanol, pH 8.

## 2.13 Zellbiologische Methoden

### 2.13.1 Anforderungen der Zellen an das Milieu

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank unter 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Sämtliche Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank (laminar flow).



### **2.13.2 Passagieren der Zellen**

Im ersten Schritt wurde einmal mit Dulbecco-PBS gewaschen und anschließend Trypsin-EDTA-Lösung (2.5 ml) zugegeben. In Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Zelllinie wurde so lange inkubiert (2-6 min), bis man im Lichtmikroskop eine deutliche Abkuglung der Einzelzellen beobachten konnte. Nach vollständiger Entfernung der Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst und nach Zugabe von frischem Medium (5 ml) durch mehrfaches pipettieren suspendiert und vereinzelt. Die suspendierten Zellen wurden in einer 1:15-Verdünnung ausgesät. Im Falle der Aussaat einer definierten Anzahl Zellen wurde die Zelldichte mit Hilfe des CASY-Zellzählgerätes bestimmt und auf die erforderliche Zellkonzentration eingestellt.

### **2.13.3 Kultivierung von ECV 304-Zellen**

Kulturmedium: 90 % Medium 199 (mit HEPES-Puffer und Earle's Salzen)+10 % fetales Kälberserum; kein Antibiotikazusatz. Die Kultivierung der adherenten ECV-304-Zellen erfolgte in 5 ml Medium in sterilen Zellkulturgefäßen (50 ml).

### **2.13.4 Kultivierung von SK-N-SH-Zellen**

Kulturmedium: MEM-Earle's + 2 mM Glutamin + 10 % fetales Rinderserum (FCS). Die Kultivierung der adherenten SK-N-SH-Zellen erfolgte in 5 ml Medium in sterilen Zellkulturgefäßen (50 ml).

### **2.13.5 Kultivierung von HaCat-Zellen**

Kulturmedium: Gibco's Keratinocyte Serum Free Medium (SFM) + BPE (25 µg/ml, Rinderhypophysenextrakt) + rEGF (0.1-0.2 ng/ml, rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor). Die Kultivierung der adherenten HaCat-Zellen erfolgte in 5 ml Medium in sterilen Zellkulturgefäßen (50 ml).

### 2.13.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eine Konservierung von Kulturzellen kann durch Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  erfolgen. So eingefrorene Zellen sind jahrelang haltbar und nach Bedarf jederzeit wieder auftau- und kultivierbar. Nach Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen Gewebekulturplatte (Durchmesser 100 mm, ca.  $5 \times 10^6$  Zellen) abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Durch Zentrifugation ( $200 \times g$ , 7 min) wurden die Zellen anschließend pelletiert und in 1.0 ml Einfriermedium (Medium, 10 % (v/v) FCS, 10 % DMSO) resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und innerhalb von 2 Tagen im Nalgene Cryo Freezing Container in Isopropanol kontinuierlich auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Für eine längere Lagerzeit wurde flüssiger Stickstoff verwendet. Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem Wasserbad. Schrittweise wurden sie in Medium (8 ml,  $4^{\circ}\text{C}$ ) resuspendiert. Nach schonender Zentrifugation ( $200 \times g$ , 7 min) wurden die Zellen erneut in Medium resuspendiert. Zum vollständigen Auswaschen des aus dem Einfriermedium stammenden DMSO wurde dieser Vorgang erneut wiederholt und konnte zur ersten Passage mit Medium, dem 20 % FCS zugesetzt wurde, kultiviert werden.

### 2.13.7 Hämatoxylin-Färbung von Zellkulturen

Durchführung (saures Hämatoxylin nach Ehrlich zur Anfärbung der Zellkerne):

1. Waschen mit PBS, 5 min
2. Fixieren mit 4 % Formalin-Lsg.(pH 7.2) in PBS, 20 min
3. Waschen mit PBS, 3-4 mal jeweils 5 min
4. Hämatoxylin-Färbung (unverd. Anzuwenden) u. 3x waschen mit PBS/ Aqua dest.
5. Deckgläschen in Glycerol, 1 Tr. auf Objektträger (fixiert zur Ansicht im Mikroskop)

## 2.14 Immunologische Methoden

### 2.14.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der hier verwendeten indirekten Immunfluoreszenz-Methode bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper (Sekundärantikörper), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, eingesetzt (stammt der Primärantikörper, wie im vorgestellten Fall, aus einem Kaninchen, muss der Sekundärantikörper gegen Kaninchen-Immunglobulin gerichtet sein). Diese Methode erlaubt

mehr Flexibilität, da eine Vielzahl von Primärantikörpern mit den gleichen markierten Zweitantikörpern kombiniert werden können. Außerdem ist diese Methode um ein Vielfaches empfindlicher, da verschiedene Zweitantikörper mit den verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren können. Es gibt unterschiedliche Fixative, wobei die Auswahl von dem jeweiligen Antigen bzw. Antikörper abhängig ist. Organische Lösungsmittel wie Methanol und Aceton lösen hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Proteinstruktur auf und fällen so die Proteine aus. Quervernetzende Substanzen wie Paraformaldehyd, Formaldehyd und Glutaraldehyd bilden intermolekulare Brücken (meist zwischen freien Aminogruppen) aus und schaffen somit ein Netzwerk von verbundenen Proteinen. Vernetzende Fixative erhalten in der Regel den Gewebekontext besser, können jedoch Proteine durch die Quervernetzung unzugänglich machen.

Fluoreszenzmarkierung von Zellorganellen in situ: Durch direkte Fluoreszenzmarkierung sollten ausschließlich solche Zellorganellen und Cytoskelettkomponenten der ECV-304-Zellen dargestellt werden, welche vom mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Agrostin erreicht werden. Es wurden jeweils unterschiedlich fixierte Zellen untersucht. Es wurde der an Kaninchen-IgG gekoppelte Fluoreszenzmarker FITC verwendet (siehe Abb. 3-20 und 3-21).

**Reagenzien:**

1. Absättigungslösung: 1 % Nullserumverdünnung in PBS, pH 7.4
2. Methanol zur Sterilisierung der Deckgläschen
3. Methanol-HCl (20 %) zum Entfetten der Objektträger und Deckgläschen
4. Einbettmedium: Glycerol
5. Ethanol/ Eisessig 95/ 5, RT
6. Waschpuffer: PBS (phosphate buffered saline), pH 7.4, 10 x konz.

**Lösung zum Fixieren der Zellen:**

1. Formaldehyd, 1 % in PBS, pH 7.4, RT
2. Formaldehyd, 4 % in PBS, pH 7.4, RT
3. Aceton, -20°C
4. Methanol, 4°C

**Material:**

1. Brenner zur Sterilisierung der Deckgläschen
2. Deckgläschen, steril
3. Färbeküvette zum Waschen der Objektträger

4. Filterpapier
5. Nagellack/ Paraffin zur Fixierung der Deckgläschen
6. Objektträger
7. Petrischalen mit Deckel (als feuchte Kammern)
8. Uhrmacherpinzetten

Bei allen folgenden Arbeitsschritten musste insbesondere darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht austrocknen.

Durchführung: ECV-304 Zellen wurden auf sterilisierten Deckgläschen in einer Petrischale oder einer 6-well Gewebekulturplatte kultiviert (jeweils Zugabe von 1.5 ml Medium nach Anhaftung der Zellen auf dem Deckgläschen). Zur optimalen Vorbereitung der Zellen sollte auf eine gut vereinzelte Aussaat geachtet werden. Die Kultivierungsdauer betrug drei Tage. Es wurden sowohl Kontrollen ohne Toxininkubation verwendet, als auch mit Agrostin und Saponin vorinkubierte Zellen (Inkubationszeit: 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 72 h). Im ersten Schritt wurde das Kulturmedium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Danach wurden die adherenten ECV-Zellen zweimal mit PBS, pH 7.4, (1x konz., ca. 1,5 ml/ Schale) gewaschen. Generell wurden die Deckgläschen, sowie die Objektträger mit Methanol/ HCl entfettet, mit Ethanol oder Methanol gewaschen und ggf. zum Sterilisieren abgeflammt.

a) Formaldehydfixierung: 4 % Paraformaldehydlösung, pH 7.4, wurde zupipettiert (1-2 ml/Schale), 20 min bei Raumtemperatur fixiert und danach 3x mit PBS gewaschen und luftgetrocknet. Im folgenden Schritt konnte (optional) eine Hämatoxylinfärbung vorgenommen werden. Zur späteren Verwendung wurden während der Waschphasen Antikörperverdünnungen hergestellt und in Eis aufbewahrt.

b) Methanolfixierung: Die adherenten Zellen wurden durch Zugabe von Methanol (15 min bei 4°C) fixiert und danach 3x mit PBS gewaschen und luftgetrocknet.

c) Acetonfixierung: Die adhären Zellen wurden durch Zugabe von Aceton (10 min bei -20°C) fixiert und danach 3x mit PBS gewaschen und luftgetrocknet.

d) Fixierung mit Aceton/ Eisessig:

Die adherenten Zellen wurden durch Zugabe von Ethanol/ Eisessig, 95 % (v/v) (10 min bei RT) fixiert und danach 3x mit PBS gewaschen und luftgetrocknet. Nach der Lufttrocknung waren die Zellen lagerfähig, sobald sie mit Glycerol auf einem Objektträger fixiert wurden. Während der Fixierung wurde eine feuchte Kammer (z. B. Petrischale) hergestellt: In dieser

platzierte man ein passendes Stück Filterpapier und befeuchtete es. Die Deckgläschen wurden mit Paraffin, Nagellack o.ä. auf dem gereinigten, fettfreien Objektträger fixiert. Die Rehydratisierung erfolgte in PBS, pH 7.4 für 20 min. Die hydratisierten Zellen wurden mit 1 % Nullserum inkubiert (30 min, 4°C). Zur Optimierung wurden verschiedene Antikörperverdünnungen fertiggestellt und in Eis aufbewahrt: 1:10, 2:100, 1:100, 1:200, 1:400 (v/v in PBS). Nach erneutem Waschen erfolgte die Antikörperzugabe in die Mitte des Deckgläschens (1-2 Tropfen. Die Inkubation erfolgte erneut in der feuchten, geschlossenen Petrischale für 30 min, 4°C). Anschließend wurde, nach dreimaligem Waschen der Zellen in einer Färbeküvette, die Anti-Antikörperlösung (2.5 % in PBS) inkubiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Zur Vorbereitung der Lagerung, sowie der Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop wurde das Deckgläschen umgekehrt (Zellen nach unten!) mit den präparierten Zellen auf einen Tropfen Glycerol-Hydrogencarbonat-Puffer auf einen Objektträger gelegt (luftblasenfrei!) und angedrückt. Zuletzt wurden die Präparate getrocknet, sowie lichtgeschützt und kühl gelagert.

### **2.14.2 Immunodiffusion nach Ouchterlony**

Bei diesem Verfahren werden Reaktionen von Antigenen und Antikörpern ausgenutzt, um ein Protein zu identifizieren und falls erforderlich semiquantitativ zu bestimmen. Als Antigen dient dabei entweder ein Proteingemisch, wie zum Beispiel Proteine, die in einem Pflanzensamen vorhanden sind, oder, wie in diesem Fall, ein einzelnes, vorher durch Chromatographie gereinigtes Protein, das Agrostin. Im vorgestellten Fall wurden Kaninchen-Antiagrostinantikörper (61. Immunisierungstag) sowie ein Nullserum (1. Immunisierungstag) verwendet. Im ersten Schritt wurde das Agarosegel hergestellt (1.5 % m/V in 0.1 M Trispuffer pH 7.4). Es wurde kurz in einem Mikrowellengerät zum Sieden erhitzt, durch Rühren homogenisiert und auf einen Objektträger aufgebracht. Dieser musste vorher mit Aluminiumfolie so präpariert werden, dass das einer ca. 3 mm dicken Schicht entsprechende Volumen Agarosegel in die vorbereitete Vertiefung gegossen werden konnte. Anschließend wurden jeweils drei Löcher (ca. 2x2 mm) in jedes Gel gestanzt und die Antiseren sowie eine Agrostinlösung (1 mg/ml 0.1 M Trispuffer pH 7.4) und ein aufgereinigter Agrostinextrakt (1 mg/ml 0.1 M Trispuffer pH 7.4) in die Vertiefungen des Agarosegels eingebracht (jeweils ca. 8 µl). Das zu untersuchende Antigen bzw. die Agrostinlösung wurde in eine Vertiefung in der Mitte und die Antiseren (Antiserum und Nullserum) in die beiden äußeren Vertiefungen eingebracht. Dabei diente das Nullserum (1. Immunisierungstag) als Negativkontrolle. Alle so vorbereiteten Objektträger wurden in eine feuchte Kammer überführt und über Nacht im

Kühlschrank bei 4-8°C inkubiert. Nach Diffusion der Antikörper und der Antigene in das Gel überlagern sie sich und an einer Stelle mit optimaler Konzentration der beiden Reaktionspartner (Antiserum und Antigen, bzw. Agrostinlösung) kommt es zur Bildung eines Präzipitats, das nach 2 Tagen Inkubationszeit als Schliere im Gel mit bloßem Auge gut sichtbar wurde (siehe Abb. 2-2).

## 2.15 Proteinchemische Methoden

### 2.15.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

#### 2.15.1.1 Bradford Assay

Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wird der Farbstoff Coomassie-Brillantblau G 250 verwendet. In Gegenwart von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffs im sauren Milieu von 465 auf 595 nm aufgrund einer Komplexbildung der unprotonierten Sulfonat-Form des Farbstoffs mit dem Protein. Die Farbstoffbindung verläuft unspezifisch an hydrophobe, kationische Seitenketten des Proteins. Zur Herstellung der Stammlösung wurden 100 mg Brillantblau in 50 ml Ethanol (95 %; w/v) gelöst. Nach Zugabe von 100 ml Phosphorsäure (85 %; w/v) wurde mit Aqua bidest. auf 600 ml aufgefüllt und filtriert. Nach Zugabe von 100 ml Glycerol wurde mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung war nach 24 h einsetzbar (Bradford, 1976).

**Durchführung:** 0.1 ml der Eichlösung (Herstellung aus Humanserumalbumin) bzw. der Proteinlösung wurden mit 5 ml Farbreagens versetzt und gemischt (3 min, Ika-Minishaker). Nach 5 min. (max. 20 min) Reaktionszeit wurde die Absorption bei 595 nm gegen einen Blindwert (100 µl Aqua bidest. anstelle der Eichlösung) am Fotometer (Ultrospec II LKB Biochrom) gemessen. Anhand der ermittelten Kalibrierkurve (5 – 100 µg ad 100 µl Aqua bidest.) erfolgte die quantitative Bestimmung des Proteins.

#### 2.15.1.2 BCA Assay

Die Proteinquantifizierung mit Hilfe der BCA-Methode beruht darauf, dass Kupferionen im alkalischen Milieu durch Proteine reduziert werden ( $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ ).  $\text{Cu}^+$  bildet anschließend mit 2,2'-Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex, dessen Absorption bei 562 nm mit Hilfe eines Mikroplattenreaders (Tecan Spectra Fluor) gemessen wird (Smith et al., 1985).

Durchführung: Auf einer 96-well-Mikroplatte wurden per Dreifachbestimmung jeweils 10 µl Probe einer Proteinlösung mit 200 µl des frisch hergestellten Reagens (entsprechend den Herstellerangaben) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 35 min bei 37 °C wurde die Absorption gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Kalibrierkurve mit BSA bestimmt.

### **2.15.2 Zentrifugationsgetriebene Molekülsiebfiltration**

Mit Hilfe der Molekülsiebfiltration lassen sich die Proteinlösungen entsprechend der relativen Molekülmasse ( $M_r$ ) fraktionieren. Hierzu wurden Mikrozentrifugenfilter (Sigma, low-protein-binding) mit Membranen definierter Porengröße (MWCO.: 5/ 10/ 30/ 100 kDa; ) und einer Kapazität von 400 µl verwendet. Es wurde ein wässriger Extrakt (Konz.: 1 mg/ml, phosphatgepuffert, pH 7.2) eingesetzt und jeweils 30 min. bei 8000 rpm zentrifugiert (Biofuge, Heraeus).

### **2.15.3 Dialyse von Proteinlösungen**

Proteinlösungen geringer Volumina (zwischen 5 u. 10 ml) wurden mit Spectra/Por-CE (Celluloseester) oder mit Membranen aus regenerierter Cellulose dialysiert. Hierzu wurde zuerst das die Membran konservierende Natriumazid durch dreimaliges Waschen mit Aqua bidest. (3x10 min) entfernt. Anschließend wurde gegen die 300fache Menge eines geeigneten Puffers unter Eiskühlung über 24 h dialysiert. Proteinlösungen größerer Volumina wurden mit Hilfe von geeigneten Dialyseschläuchen umgepuffert. Anschließend wurde gegen die 300fache Menge Puffer unter Eiskühlung und mehrfachem Pufferwechsel über 24 h dialysiert.

### **2.15.4 Lyophilisierung von Proteinlösungen**

Nach abgeschlossener Dialyse wurde die Proteinlösung (maximale Kapazität: 3 x 150 ml) auf -80°C vorgekühlt und 24 h zur Trockne lyophilisiert. Nachfolgend musste aufgrund der gestiegenen Salzkonzentration erneut dialysiert werden.

## 2.15.5 Proteinfällungen

### 2.15.5.1 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung hat gegenüber der Acetonfällung den Vorteil, dass keine irreversible Denaturierung der Proteine erfolgt und ist demzufolge die Methode der Wahl, um mit den gewonnenen Fraktionen mit intaktem Protein Zytotoxizitätstests durchführen zu können. Zunächst wurde bei RT eine gesättigte Ammoniumsulfat  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ -Lösung hergestellt: unter Rühren wurde eine 50, 60, sowie eine 70 % ige (w/v), gesättigte wässrige Lösung hergestellt, bis ein Niederschlag auftrat. Diese Lösungen wurden, beginnend mit der geringsten Konzentration, im Verhältnis 2:1 zur Proteinlösung gegeben und 1 h unter Rühren und Eiskühlung inkubiert. Anschließend wurden die ausgefällten Proteine abzentrifugiert (15000 x g, 10 min), in Puffer aufgenommen und gegen den entsprechenden Puffer dialysiert, um das restliche Ammoniumsulfat zu entfernen. Entsprechend wurde die Fällung mit den beiden nächsthöher konzentrierten  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  -Lösungen durchgeführt. Die drei erhaltenen Fraktionen wurden nach erfolgter Dialyse lyophilisiert.

## 2.15.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Pufferlösungen für die Gelelektrophorese:

1. 4 x SDS-Probenpuffer: 250 mM Tris/ HCl, pH 6.8, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0.04 % (w/v) Bromphenolblau, 8 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol
2. 10 x Elektrophoresepuffer: 20 mM Tris/ HCl, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS
3. Fertiggelepuffer: 1.5 M Tris/ HCl, pH 8.8, 0.4 % (w/v) SDS

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) im diskontinuierlichen Puffersystem nach Lämmli (Lämmli, 1970) unter Verwendung der Mini-Protean II Elektrophorese-Apparatur (Biorad) durchgeführt. Es wurden grundsätzlich diskontinuierliche Gele verwendet (10-20 % oder 4-20 % (v/v) Acrylamid, 10 wells, 30  $\mu$ l). Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der Protein-Molekulargewichte eingesetzt. Das exakte Molekulargewicht eines Proteins erhält man erst nach Aufspaltung der globulären Proteine und Lösen ihrer Tertiär-und Sekundärbindungen (Erhitzen der Probe auf 95°C mit



einem Überschuss von SDS), sowie unter reduktiven Bedingungen (z. B.  $\beta$ -Mercaptoethanol), die zur Aufspaltung von Schwefelbrücken führen und die Proteine zu ellipsoiden Aminosäureketten aufspalten. Es lassen sich also nur die Molekulargewichte von Untereinheiten exakt bestimmen. Da Glykoproteine langsamer laufen als nicht-glykosylierte Proteine (sie werden mit weniger SDS beladen), wurde für das zu isolierende Agrostin immer ein Agrostin-Standard (Sigma) verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit ist die Aussage über die relative Molekülmasse im Vergleich zum jeweiligen Standard ausreichend. Das Polyacrylamid-Fertiggel wurde im ersten Schritt in eine Elektrophoresekammer eingespannt, der Elektrodenpuffer eingefüllt und die in Laemmli-sample buffer gelösten Proben in die Taschen des Gels pipettiert. In jedes Gel wurde als Referenz der LMW-Molekulargewichtsmarker aufgetragen (siehe Abschnitt 3.4.3). Die Trennung der Proteingemische wurde in Elektrophoresepuffer über 45-95 min bei einer Stromstärke von 120/ 200 V und 40 mA durchgeführt.

#### 2.15.6.1 Lösungen für die Gelfärbung, die Gelentfärbung und das LMW-calibration-kit

Coomassielösung: 0.1 % (w/v) Coomassie Blue R-250, 10 % (w/v) Eisessig, 40 % (v/v) Methanol, filtriert (alternativ: 1 x Coomassie stain solution, Biorad)

Entfärbelösung: 7.5 % (v/v) Essigsäure, 20 % (v/v) Ethanol (alternativ: 1 x Coomassie R-250 destain solution, Biorad)

LMW-Standard vorgefärbter low-molecular-weight-Standard zur Kalibrierung der Elektrophorese (Pharmacia):

Phosphorylase b	97.4 kDa
Rinderserumalbumin	66.2 kDa
Ovalbumin	45.0 kDa
Trypsin-Inhibitor	21.5 kDa
$\alpha$ -Lactalbumin	14.4 kDa

#### 2.15.6.2

### Färben mit Coomassie Blau

Das zu färbende Polyacrylamidgel wurde der Gelkassette entnommen und mind. 30 min in 75 ml frisch hergestellter Coomassie-Färbelösung inkubiert. Dadurch wurden die Proteine zugleich angefärbt und fixiert.

#### 2.15.6.3 Entfärben der Gele

Anschließend wurde das Gel unter mehrfachem Wechsel so lange auf dem Schüttler entfärbt, bis die Hintergrundfärbung weitgehend entfernt war. Zur weiteren Lagerung wurde das Gel in Aqua dest. überführt. Mit dieser Methode lassen sich ca. 0.1 µg Protein pro Bande nachweisen.

#### 2.15.6.4 Trocknen der Gele

Nach Beendigung aller Färbe- und Entfärbeschritte wurde das Gel mit Aqua dest. äquilibriert und mit 25 ml Gel Dry-Trocknungslösung (LC 4025) pro Gel 20 min zusammen mit vorgequollener (2 min in Gel Dry Lösung) Cellophanfolie abgedeckt geschüttelt. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei in die vorgequollene Cellophanfolie eingeschlagen und zwischen Filterpapier im Geltrockner langsam auf 80°C (90 min) erwärmt und getrocknet. Das Gel wurde nach diesem Schritt digitalisiert und über einen längeren Zeitraum gelagert.

#### 2.15.6.5 Proteinmarkierung mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488

Die Kopplung von Proteinen mit Alexa Fluor 488 gehört wie der Fluoreszenzfarbstoff FITC zu den gebräuchlichsten Methoden, um ein Protein oder ein Antigen zu markieren und fluoreszenzmikroskopisch darzustellen. Der Vorteil dieser Methode besteht zum einen in der größeren Stabilität des Farbstoffs in einem pH-Spektrum von pH 4 bis pH 10; zum anderen bietet diese Methode die Möglichkeit, sowohl in fixierten als auch in lebenden Zellen den Weg des markierten Agrostins in das Cytosol zu verfolgen, da hier im Gegensatz zum immunologisch gekoppelten FITC bereits vor der Inkubation eine Proteinmarkierung durchgeführt wird. Das Alexa Fluor 488 - markierte Protein hat ein Absorptionsmaximum von 494 nm sowie ein Fluoreszenzemissionsmaximum von 519 nm. Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist ein 2, 3, 5, 6-Tetrafluorophenylester, der sich insbesondere in gelöster Form durch eine höhere Stabilität auszeichnet als der früher gebräuchliche Succinimidylester. Markierung des Agrostins mit Alexa Fluor 488:

Zunächst wurde eine 1 M Natriumbicarbonat-Lösung (pH 9) hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde anhand des BCA-Assays auf 2 mg/ml (1.0 mg/ 0.5 ml Agrostin) eingestellt und ggf. aufgereinigt, da primäre Amine und Ammoniumsalze die Reaktion stören. Anschließend wurden 0.5 ml der Proteinlösung und 50 µl der Natriumbicarbonat-Lösung zugesetzt, da der TFP Ester effizienter im alkalischen Milieu mit dem Protein konjugiert werden kann. Diese Lösung wurde der auf RT erwärmten Farbstofflösung zugesetzt und eine Stunde bei RT mit Hilfe eines Magnetrührers gemischt.

Isolierung des markierten Agrostins:

Nach Herstellung des Elutionspuffers (PBS, 10 ml) wurde die Säule vorbereitet und beladen (PBS, pH 7.2, 2 mM Natriumazid). Um die Zone des markierten Proteins zu erkennen, wurde die Säulenchromatographie unter Zuhilfenahme einer UV-Lampe durchgeführt. Die obere farbige Zone der Säule entsprach dabei der des nicht gekoppelten Farbstoffs, die untere war die zu sammelnde mit dem Alexa Fluor 488-konjugierten Agrostin. Zur Sicherheit wurden die anderen Fraktionen ebenfalls gesammelt, um für den Fall eventuell auftretender, geringer Trennschärfe, die Fraktionen mit nicht markiertem Protein wiederverwenden zu können. Zuletzt wurde die fluoreszenzmarkierte Proteinlösung (in PBS, pH 7.2 und 2 mM Natriumazid) aliquotiert und bei 6°C gelagert bzw. für eine längere Lagerung bei -20°C eingefroren.

## 2.16 Fluoreszenzmikroskopie mit Alexa Fluor 488-markiertem Agrostin

### Material:

1. Brenner zur Sterilisierung der Deckgläschen
2. Deckgläschen, steril
3. Filterpapier
4. Objektträger, steril
5. sterile 6-well-Gewebekulturplatten
6. Uhrmacherpinzetten

Bei allen folgenden Arbeitsschritten musste insbesondere darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht austrocknen. Generell wurden die Deckgläschen und die Objektträger mit Methanol/ HCl entfettet, mit Ethanol oder Methanol gewaschen und ggf. zum Sterilisieren abgeflammt.

Durchführung: ECV-304 Zellen wurden auf sterilisierten Deckgläschen in einer 6-well Gewebekulturplatte kultiviert (jeweils Zugabe von 2.0 ml Medium nach Anhaftung der Zellen auf dem Deckgläschen). Zur optimalen Vorbereitung der Zellen wurde auf eine gut vereinzelte Aussaat geachtet. Die Kultivierungsdauer betrug 24 h. Es wurden sowohl Kontrollen ohne Toxininkubation verwendet als auch mit markiertem Agrostin und Saponin vorinkubierte Zellen (Inkubationszeit: 0.5, 1, 2, 3, 12, 24, 48h). Zusätzlich ist ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt worden, in dem die Aktivität des markierten Agrostins überprüft wurde, um eine mögliche Inaktivierung des Agrostins durch die Kopplung mit dem Farbstoff auszuschließen. Im ersten Schritt wurde das Kulturmedium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Danach wurden die adherenten ECV-Zellen zweimal mit PBS, pH 7.4, (1x konz., ca. 1,5ml/ Schale) gewaschen.

Formaldehydfixierung: Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurde 4 % Paraformaldehydlösung, pH 7.4, zupipettiert (2 ml/well), für 20 min bei Raumtemperatur fixiert und danach 3x mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Im folgenden Schritt kann (optional) eine Hämatoxylinfärbung vorgenommen werden. Zur Vorbereitung der Lagerung, sowie der Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop wurde das Deckgläschen umgekehrt (Zellen nach unten!) mit den präparierten Zellen auf einen Tropfen Glycerol-Hydrogencarbonat-Puffer (pH 8.0) auf einen Objektträger gelegt. Zuletzt wurden die Präparate getrocknet und lichtgeschützt und kühl gelagert (siehe Abb. 3-20 und 3-21).

## 2.17 Toxinspezifische Methoden

### 2.17.1 Toxizitätsassays

#### 2.17.1.1 Zytotoxizitätsuntersuchung unter Verwendung des CASY-Zellzählgerätes

Das Zellzählgerät (CASY; Schärfe System GmbH) diente der Erstellung eines Zellproliferationsassays. Das Prinzip der Messung beruht auf der Partikelmessstechnik mit Widerstandsmessung. Die Pulsflächenanalyse dient der Signalauswertung. Zur Messung werden die Zellen in einem schwachen Elektrolyten suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt. In einer Präzisionsmessspore wird eine konstante Spannung angelegt, die einen definierten elektrischen Widerstand ergibt. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Da Zellen in erster Näherung als Isolator betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung, die ein Maß für das Volumen der Zellen ist. Voraussetzung für eine Messung ist, dass die Zellen die Kapillare einzeln passieren. Nach Durchführung der Einzelmessungen wird das Integral des Messsignals (Pulsflächenanalyse) und aus der volumenlinearen Originalverteilung eine durchmesserlineare Größenverteilung berechnet sowie alle weiteren Parameter auf der Basis dieser Verteilung ermittelt.

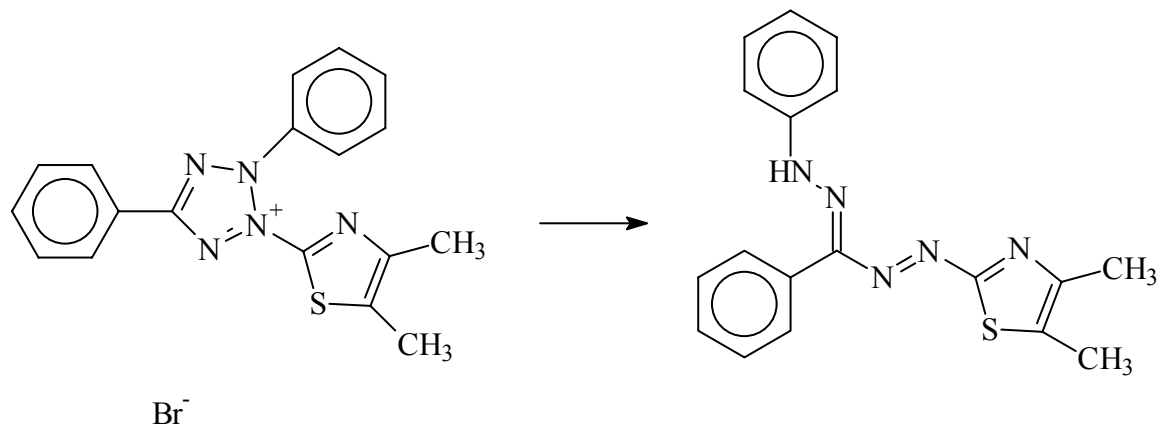
Durchführung:

In einer 24-well-Platte wurden  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well ausgesetzt und nach 3 Tagen Kultivierung die Zellzahl ermittelt. Der Überstand wurde entfernt und die Zellschicht am Boden des Gefäßes mit einer Trypsin/ EDTA-Lösung abgelöst, aufgenommen und umgehend mit Hilfe des CASY-Systems ausgezählt. Die Proliferationsrate wurde sowohl für die Kontrollen (unbehandelte Zellen), als auch für die mit Extrakt behandelten Zellen bestimmt.

#### 2.17.1.2 MTT Assay (für ECV-Epithelzelllinie und SK-N-SH-Neuroblastomzelllinie)

Das Prinzip der MTT-Methode (Mosmann, 1983) beruht auf der Reduktion des schwach gelb gefärbten, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes MTT (4,5-Dimethylthiazpyl-2-)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid zum tiefblau-schwarz gefärbten, wasserunlöslichen Formazan. Dieser enzymatisch katalysierte Reduktionsschritt findet in den Mitochondrien statt, in denen sich der Farbstoff anreichert. Die Färbung innerhalb der Zellen ist sowohl visuell als auch mikroskopisch gut zu erkennen. Durch die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln ist es

möglich, das im Zellinneren kristallin abgelagerte Formazan in saurem Isopropanol in Lösung zu bringen. Die Menge des extrahierten, reduzierten Farbstoffes entspricht der Metabolisierungsaktivität der Zellkultur und es kann anhand einer Eichgerade auf die Zellzahl zurückgeschlossen werden. Es handelt sich um einen kolorimetrischen, nicht-radioaktiven Test, der auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes zu Formazankristallen durch zelluläre Dehydrogenasen beruht. Die Absorption des entstandenen Formazans wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550-600 nm bestimmt, bei der MTT nicht absorbiert. Da Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen aktiv sind, dient die Umwandlung von MTT als Maß für die Viabilität der Zellen (Mosmann, 1983). Aus den Absorptionswerten der einzelnen Wells mit unbehandelten Zellen (Zellkontrolle) wurde der Mittelwert berechnet und dieser als 100 % festgelegt.



**Abb. 2-1:** TTReduktion von MTT zu Formazan (Mosmann, 1983).

Im einzelnen umfasst die Durchführung dieses Testes folgende Schritte:

- Kultivierung der Zellen (24-Well-Platte) über einen Zeitraum von 3 Tagen
- Mediumwechsel
- Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Farbstoffstammlösung (4 mg MTT/ ml)
- Inkubation bei 37°C, 60 min
- Absaugen des Kulturmediums von den Endothelzellen
- Zugabe von 0.5 ml saurem Isopropanol ( 0.1 % HCl/ Isopropanol (v/v))
- Farbstoffextraktion auf dem Schüttler (30 min, RT)
- Messung der Absorption bei 578 nm gegen Aqua bidest. in 96-well-Platte

### 2.17.1.3 Amidoschwarz-Assay (für HaCat-Keratinozytenlinie)

Der Amidoschwarz-Assay (Schulz et al., 1994) beruht auf der Anfärbung der noch anhaftenden Zellen (Messwellenlänge: 620 nm am SLT- Mikrotiterplattenreader). Eine Differenzierung zwischen intakten und geschädigten, aber noch anhaftenden Zellen ist nicht möglich. Bei diesem Assay kamen 96 well-Platten zum Einsatz. Da dieser Assay eine relativ unspezifische Methode ist, dessen Prinzip auf der Anhaftung noch am Kulturgefäß anhaftender, gefärbter Zellen beruht, ist bei diesem Test keine Differenzierung von abgestorbenen, geschädigten und intakten Zellen möglich.

verwendete Lösungen:

- Formaldehydlösung, 10 % (v/v) [Lösung 1]
- Amidoschwarzstammlösung, 0.1% (w/v) in aqua bidest [Lösung 2]
- Aqua bidest (eingestellt auf pH 3.0) [Lösung 3]
- 0.05 N NaOH [Lösung 4]

Arbeitsschritte:

- Inkubation der HaCat-Zellen mit den Untersuchungssubstanzen über einen definierten Zeitraum
- Fixieren (15 min) der Zellen mit Formaldehydlösung [Lösung 1]: 10 µl/well
- Entfernung der Formaldehydlösung und Zugabe von Amidoschwarzstammlösung [Lösung 2] (100 µl/ well), 30 min inkubieren und absaugen.
- Waschen mit Lösung 3 (150 µl/ well). Der Überstand wird verworfen.
- Zugabe von Lösung 4 (150 µl/ well); 10 min schütteln (SLT Shaker); Absorptionsmessung bei  $\lambda = 620$  nm.

Alle Reaktionsansätze wurden als Vierfachbestimmungen ausgeführt und die Versuche mindestens einmal wiederholt. Der U-Test nach Wilcoxon diente der statistischen Ermittlung der aus den Zellzählungen erhaltenen Daten. Die Mittelwerte der Zellzahlen dienten als Grundlage für die Berechnungen. Als Streuungsmaß wurde die Spannweite verwendet. Bei jedem Versuchsansatz wurden jeweils vier 100 %-Kontrollen mitgeführt. Die 100 %-Kontrollen umfassen die jeweiligen Ansätze, bei denen keine Substanz zugegeben wird, bei denen das Zellwachstum also unbeeinflusst bleibt. Das relative Zellwachstum wurde be-

stimmt, indem man die Differenz der Ausgangszellzahl von  $5 \cdot 10^4$  Zellen mit der nach drei Tagen bestimmten Zellzahl bildete. Die prozentuale Zellproliferationsrate bezieht sich auf diese Werte. Diejenige Toxizität, die zur Unterschreitung der Ausgangszellzahl führte, bzw. bei der keine lebensfähigen Zellen erfasst werden konnten, wurde als  $IC_{100}$  definiert. Anhand einer Eichgerade wurde das Verhältnis zwischen der prozentualen Zellproliferationsrate und der aus dem MTT-Test resultierenden Absorptionen bestimmt.

Geradengleichung:  $y = 139.96x + 1,946$  ( $R = 0.9303$ )

Der prozentuale Überlebensindex ( $SI$ ) wurde folgendermaßen bestimmt:

$Test_{[Mittelwert (Absorption \text{ Versuchswert})]} - A_{[Mittelwert (Absorption \text{ Leerwert})]} = Absorption_{(Versuchsansatz)}$

$B_{[Mittelwert (Absorption \text{ 100\%-Kontrolle ohne Toxin})]} - A_{[Mittelwert (Absorption \text{ Leerwert})]} = Absorption_{(100\%-Kontrolle)}$

Daraus ergibt sich für die Zellproliferationsrate  $SI (\%) = \frac{Test - A}{B - A} \times 100$

Ermittlung der Werte für die  $IC_{50}$ :

Die berechneten Werte für die relativen zellproliferationshemmenden Aktivitäten [%] wurden in Diagrammen, in denen die Abhängigkeit der Zellproliferation [%] von der eingesetzten Extraktkonzentration unter halblogarithmischer Skalierung dargestellt wird, zusammengefasst. Nach Einengung der Regressionsgrenzen auf einen linearen Anstiegsbereich wurde die lineare Regression zur Ermittlung der  $IC_{50}$ -Werte genutzt.

### 2.17.2 Proteolytische Spaltung von Diphtheriatoxin

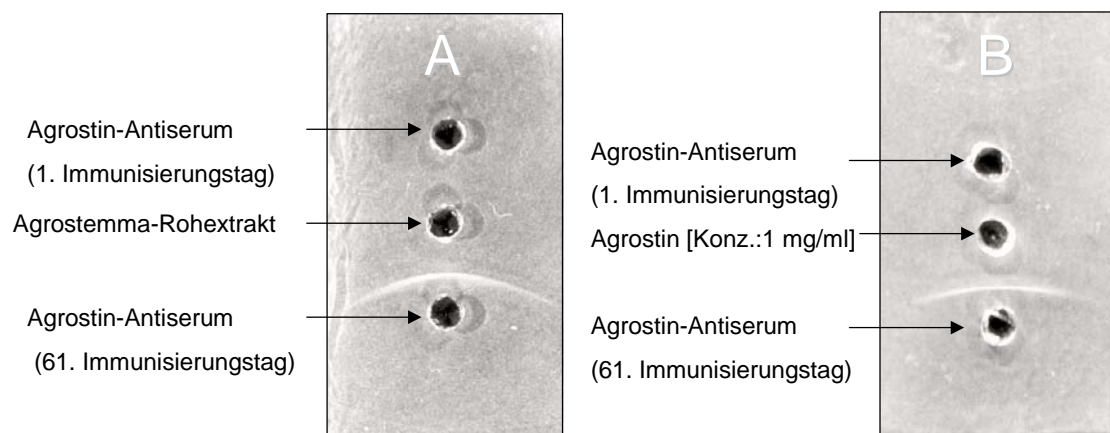
Die enzymatische Spaltung von Diphtheriatoxin (DT) mit Trypsin erfolgte nach einem Verfahren von Moskaug (Moskaug et al., 1989). Hierzu wurde DT (100  $\mu$ g) mit Trypsin (1  $\mu$ g) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert, bis die Reaktion durch Zugabe von Trypsininhibitor aus Sojabohnen gestoppt wurde (2  $\mu$ g, 37 °C, 10 min). Anschließend wurde der Ansatz mit 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und für 10 min in einem kochenden Wasserbad erwärmt. Bei diesem Schritt fiel die instabile B-Kette des Toxins aus und konnte anschließend abgetrennt werden (20000 x g, 10 min). Der Überstand wurde gegen Wasser dialysiert. Die Bestimmung der Aktivität der A-Kette von Diphtheriatoxin erfolgte durch



einen ADP-Ribosylierungsassay (Zhang, 1997), der auf der enzymatischen Aktivität des Toxins beruht, in Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  den Elongationsfaktor II (EF II) unter Freisetzung von Nicotinamid mit ADP zu ribosylieren (Langer et al., 1996; Keller, 2002).

### 2.17.3 Isolierung der eingesetzten Toxine und ihrer Spaltprodukte

Die Isolierung des Agrostins erfolgte nach Aufreinigung des Extraktes (siehe Abschnitt 3.4) mittels Kationenaustauschchromatographie (CM-Cellulose) und einem 0.1-0.3 M NaCl-Gradienten nach einem Verfahren von Stirpe et al. (Hebestreit & Melzig, 2003; Stirpe et al., 1983). Zur Identifizierung des Agrostins wurde neben dem Vergleich mit einer authentischen Probe per SDS-PAGE (siehe Abb. 3-3 und 3-4) ein Ouchterlony-Immunodiffusionstest durchgeführt (siehe Abb. 2-2). Die Quantifizierung des Agrostins erfolgte durch den BCA-Assay und einen semiquantitativen Ouchterlony-Immunodiffusionstest. Die Konzentration des Agrostin-Lyophilisats (Sigma) beträgt ca. 30 % (ermittelt durch Lowry-Assay), die Konzentrationsbestimmung des selbst isolierten Agrostins beträgt ca. 14 % (ermittelt durch BCA-Assay).



**Abb. 2-2:** Ouchterlony-Immunodiffusionstest

A) Identitätsuntersuchung des Agrostins im Agrostemma-Rohextrakt: Präzipitat zw. Agrostin-Antiserum (61. Immunisierungstag) und dem Rohextrakt.

B) Identitätsuntersuchung des isolierten Agrostins: Präzipitat zw. Agrostin-Antiserum (61. Immunisierungstag) und dem isolierten Agrostin.

### 2.17.4 Isolierung der aktiven Domäne (DTA) des Diphtheriatoxins

Kommerziell erhältliches Diphtheriatoxin (Sigma) diente zum einen als Positivkontrolle für die Zytotoxizitätsuntersuchungen, zum anderen als Ausgangsmaterial zur Darstellung der

aktiven Domäne DTA (siehe Abb. 1-1). Die Isolierung der katalytischen Domäne (A-Kette) von Diphtheriatoxin erfolgte auf proteinchemischem Weg durch eine enzymatische Spaltung mit Trypsin nach einem Verfahren von Moskaug *et al.*. Diphtheriatoxin verfügt über eine natürliche Spaltstelle innerhalb einer protease-sensitiven Schleife. Diese wird normalerweise im Rahmen der intrazellulären Aktivierung eines solchen Toxins von furinähnlichen Enzymen umgesetzt (Moskaug *et al.*, 1989).

Experimentell erfolgte die Spaltung von A- und B-Kette mit Hilfe von Trypsin sowie Trypsininhibitor zur Beendigung der Reaktion. Die instabile B-Kette wurde nachfolgend durch Hitze denaturiert und abgetrennt. Die A-Kette von DT (DTA;  $M_r$ : 21 kDa) wurde nach diesem Verfahren mit einer Ausbeute von 20-25 % isoliert. Die ADP-Ribosylierungsaktivität blieb auch nach der Aufreinigung der A-Kette erhalten.

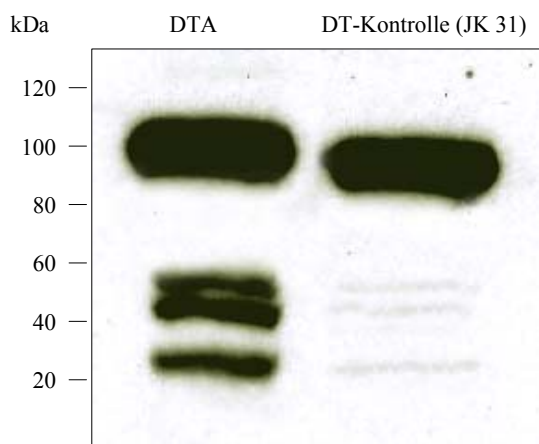
#### 2.17.4.1 Überprüfung der Aktivität von Diphtheriatoxin A (DTA)

Diphtheriatoxin (DT u. DTA: siehe Abb. 1-1) diente als Positivkontrolle ( $IC_{50}$ :  $1.27 \cdot 10^{-7}$  mM, siehe Tab. 3-5 und Abb. 3-19). DT ist als bakterielles Proteintoxin in der Lage, den Elongationsfaktor II (EF II) in Anwesenheit von  $NAD^+$  an einem modifizierten Histidin durch ADP-Ribosylierung so zu verändern, dass er inaktiviert und die Proteinbiosynthese eingestellt wird. Diese Aktivität fehlt RIPs aus pflanzlichem Ursprung gänzlich, da hier ein anderer Mechanismus der Proteinsynthesehemmung vorliegt. Aufgrund dieser spezifischen Eigenschaft bakterieller Proteintoxine wurde ein zellfreies Testsystem etabliert. Biotinmarkiertes  $NAD^+$  dient dem Aktivitätsnachweis durch Bildung einer EF II-Bande bei ca. 100 kDa im Immunoblot (siehe Abb. 2-4; Collier & Kandel, 1971; Zhang *et al.*, 1997).



**Abb. 2-3:** ADP-Ribosylierungsassay: Schematische Darstellung der ADP-Ribosylierung von EF II; die Markierung mit Biotin-17- NADPP+PP ist in Punktform dargestellt (Langer, 1996; Keller, 2002).

Pro Ansatz wurden 10 µl angereicherter EF II mit 5 µl 6-Biotin-17-NAD<sup>+</sup> (Endkonzentration 50 µM) versetzt. Die zu testenden Proteinlösungen wurden in Volumina von bis zu 2 µl zugesetzt. Anschließend wurde EF II-Puffer bis auf ein Endvolumen von 25 µl zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Verwendung von biotinyliertem NAD<sup>+</sup> ermöglichte anschließend durch Auftreten einer mit Anti-Biotin-Antikörper anfärbbaren Bande bei circa 100 kDa eine Detektion des modifizierten EF II im Immunoblot. In der von der Arbeitsgruppe Dr. Fuchs durchgeführten Aktivitätsüberprüfung (Abb. 2-3) trat eine ausgeprägte Bande bei ca. 100 kDa (ein positiver Aktivitätsnachweis des isolierten DTA) auf (Abb. 2-4).



**Abb. 2-4:** ADP-Ribosylierungsassay: Durch die enzymatische Aktivität der DTA-Kette wird die ADP-Ribosylierung von Elongationsfaktor II vermittelt und im Immunoblot bei ca. 100 kDa detektiert. (Zhang, 1997).

EF II-Puffer: 20 mM Tris / HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT

### 2.17.5 Isolierung der enzymatisch aktiven A-Kette (RTA) von Ricin

Die Exprimierung und Reinigung der enzymatisch aktiven A-Kette des Ricins (siehe Abb. 1-1) wurde von Herrn Dr. Fuchs am UKBF/ Charité in Berlin durchgeführt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Proteinkonzentration (RTA) beträgt 75 µg/ml (3 ml; Puffer: 5 mM MES, pH 5.5, NaCl, Leitfähigkeit 30 mS, ca. 300 mM, Reinheit: 90 % (Coomassie). Die Überprüfung der Identität erfolgte über die molare Masse und einen anti-RTA Westernblot. Das Ergebnis des Aktivitätassays ergab eine Freisetzung von 75 pmol Adenin pro pmol RTA pro Stunde.

## 2.18 Chromatographische Methoden

### 2.18.1 Gelfiltrationschromatographie

verwendetes Säulenmaterial:

- Sephadex G 25
- Sephadex G 50
- Sephadex G 75
- Hiload Superdex 75

Die Gelfiltrationen wurden an einer MPLC- Anlage (medium pressure liquid chromatography), sowie an einer FPLC- Anlage (fast protein liquid chromatography) am FMP, dem Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, durchgeführt. Zunächst wurde die aufzutragende Probe auf ein Volumen von maximal 0.5 ml eingengt. Die MPLC- Untersuchungen wurden mit 1.5 Säulenvolumina PBS bei einer Flussrate von 1.0 ml/ min eluiert (Sephadex G 75/ G 50 Superfine, Säulenmaße: 4.5 x 40 cm, 190 ml; Elution mit 0.14 M NaCl, 50 mM PBS, pH 7.2; Fraktionsvolumina: 2.0 ml). Die Fraktionen wurden elektrophoretisch auf Agrostin untersucht, lyophilisiert, dialysiert und schließlich der Kationenaustauschchromatographie (CM-Cellulose, s.u.) unterzogen. Die FPLC- Untersuchungen (Fast-Protein-LC: HiLoad Superdex 75, Partikelgröße: 34 µm; Säulenmaße 2.6 x 60 cm, 320 ml) wurden mit 1.5 Säulenvolumina 20 mM Tris-Puffer und 140mM NaCl bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert.

### 2.18.2 Kationenaustauschchromatographie

Säulenmaterial: CM (Carboxymethyl-) Cellulose

Anhand der unterschiedlichen Ladungen von Proteinen, die in Abhängigkeit vom pH-Wert des Milieus und vom isoelektrischen Punkt variieren können, lassen sich diese säulenchromatographisch auftrennen. Bei einem Kationenaustausch binden positiv geladene Proteine an eine negativ geladene Säulenmatrix, von der sie anschließend durch Lösungen hoher Salzkonzentration eluiert werden. Die Probe wurde zunächst gegen Startpuffer dialysiert, auf die mit Startpuffer (5 mM Sörensen-Phosphatpuffer, pH 6.5) äquilibrierte Säule aufgebracht und mit der gleichen Pufferlösung durch einen 0.0 - 0.3 M NaCl Gradienten eluiert (Fraktionsvolumina: 2.0 ml, Flussrate 1 ml/min). Die erhaltenen Fraktionen wurden dialysiert, lyophilisiert und sowohl elektrophoretisch als auch immunologisch (siehe Ouchterlony-Immunodiffusionstest) auf das Vorhandensein von Agrostin untersucht.

### 2.18.3 Dünnschichtchromatographie

Insbesondere zur Prüfung verschiedener Proteinfractionen auf Saponine kommt die Dünnschichtchromatographie zum Einsatz. Hierzu wurde aus den lyophilisierten Fraktionen ein methanolischer Extrakt bereitet und mit Hilfe des Auftragegerätes gemeinsam mit der Referenzlösung des jeweiligen Saponins bandenförmig auf eine DC-Platte (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) aufgetragen.

Detektionsmittel für Triterpensaponine: Wasser (die Platten wurden mit reichlich Wasser besprüht, bis das Adsorbens vollständig durchtränkt war). Die Auswertung erfolgte im VIS (helle Saponinzonen sichtbar).

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (85 ml CH<sub>3</sub>OH, 10 ml Eisessig, 5 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 ml Anisaldehyd-Reagenz); die Platte wurde kräftig besprüht und bei 100 °C 5-10 min auf einer Heizplatte erhitzt, bis die Substanzzonen erschienen; die Auswertung erfolgte im VIS (braune Saponinzonen sichtbar) und im UV<sub>365</sub> (Siepmann et al., 1998).

a) Komarowsky-Reagenz: 5 VT p-Hydroxybenzaldehyd (2 % in Methanol)  
2 VT H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50%)

Fließmittel für Triterpensaponine:

FM I	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	9:1.5
FM II	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O	6:4:0.8
FM III	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O	6:3:1 (untere Phase)
FM IV	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O	6:3.5:1
FM V	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O	7.5:5:1
FM VI	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH-AcOH-H <sub>2</sub> O	15:8:3:2

Fließmittel für Sapogenine:

FM VII	Toluol-Me <sub>2</sub> CO	4:1
--------	---------------------------	-----

#### 2.18.4 Isolation von Agrostemmasaponin-Rohsaponingemischen

Für sämtliche Untersuchungen wurde das Samenmaterial des Genotyps „K5“ (Reg. No. AGRO 26/80; 1992) verwendet, welches von der Bundesanstalt für Züchtungsforschung in Quedlinburg zur Verfügung gestellt wurde.

Nach dem Mahlen des Samenmaterials wurde in einer Soxhlet-Apparatur mehrstündig entfettet, zweimal mit 50 % igem Methanol kalt extrahiert und anschließend zentrifugiert. Der Methanol-Extrakt wurde schonend im Vakuumrotationsverdampfer vom Extraktionsmittel befreit. Der so entstandene Methanol-Trockenextrakt wurde anschließend in Wasser aufgenommen und mit n-Butanol (pH 1.5) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde entfernt und die n-Butanolphase getrocknet, in Wasser aufgenommen und einer Gelpermeationschromatographie an Sephadex G 25 unterzogen. Das so erhaltene Rohsaponingemisch wurde schließlich durch Umkehrphasen-HPLC an RP 18 unter Verwendung von Chloroform-Methanol-Wasser weiter aufgereinigt und die Saponine mittels DC durch Detektion mit Wasser/Anisaldehyd-Schwefelsäure nachgewiesen. Die Ergebnisse der DC/HPLC-Chromatogramme wurden schließlich mit denen von Siepmann et al. verglichen (Siepmann et al., 1998) und die Fraktionen jeweils einem Zytotoxizitätstest unterzogen. Zusätzlich wurde eine dünnschichtchromatographische Isolierung von Saponinum album durchgeführt und das isolierte Material sauer hydrolysiert. Das entstehende Aglykon Gypsogenin wurde ebenfalls auf seine Zytotoxizität getestet (siehe Abschnitt 3.8.1).

### 2.18.5 Isolierung der Hauptkomponenten von Saponinum album

Zur Isolierung der Hauptkomponenten von Saponinum album (Merck) wurde im ersten Schritt eine Fließmitteloptimierung für die DC und die SC durchgeführt. Von 8 getesteten Fließmitteln erwies sich das folgende FM-System als optimal:

Chloroform/ Methanol/ Wasser (67.0/ 27.6/ 5.4)

Detektionsmittel: Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz

Die säulenchromatographische Trennung wurde mit einer Kieselgel 60-Säule (300 mm x 32 mm; 82.0 g Kieselgel; 0.82 g Saponinum album, Belastung 1:100; Vorlauf: 300 ml) durchgeführt. Adsorptionsmittel: Chloroform/ Methanol/ Wasser (67.0/ 27.6/ 5.4)

Die DC-Überprüfung erfolgte analog der o.a. Vorgabe bei einem Fraktionsvolumen von 30 ml und einer Anzahl von 144 Fraktionen, die im DC 2 Hauptkomponenten aufwiesen, welche im weiteren Verlauf einem Zytotoxizitätsassay unterzogen wurden.

### 2.18.6 Identifizierung von Gypsogenin durch saure Hydrolyse

Zur Identifizierung von Gypsogenin aus Saponinum album wurde zuerst mit der jeweiligen Saponinlösung (3 mg in 5 ml 2 N wässriger  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (m/v)) über 3 h eine Rückflusskühlung auf einem Wasserbad durchgeführt. Danach wurde das Gemisch mit 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und schließlich im Scheidetrichter mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 5 ml) extrahiert (Gaidi et al., 2001). Die vereinigten Dichlormethan-Extrakte ergaben durch Vergleich mit authentischem Material (Gypsogenin, bzw. Astrantiagenin D und Quillajasäure) Gypsogenin als Hauptkomponente und Quillajasäure als Nebenkomponekte des isolierten Rohsaponingemisches (Hiller et al., 1973).

## 2.19 Biophysikalische Methoden

### 2.19.1 Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)

Die ursprünglich verwendete Zellkultur (MDCK-II) wurde im ersten Schritt durch ECV 304-Zellen ersetzt, um möglichst vergleichbare Bedingungen zu schaffen (Wegener et al., 2000). Bei einer angelegten Frequenz von 40 kHz gilt eine lineare Abhängigkeit zwischen der gemessenen Kapazität und dem Ausmaß der Zellspreitung als notwendige Voraussetzung für

weitere Messungen. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in PBS-Puffer angelöst, sterilfiltriert und unter Reinraumbedingungen in unterschiedlichen Konzentrationen im Medium (Earle's 199) gelöst:

1. c (Saponin): 3.0 µg/ml; 6.0 µg/ml; 12.5 µg/ml; 25.0 µg/ml; 50.0 µg/ml; 100.0 µg/ml
2. c (Agrostin): 4.0 ng/ml; 20 ng/ml; 100.0 ng/ml; 0.5 µg/ml; 1.0 µg/ml; 5.0 µg/ml

Die Zellen wurden in einem 8 well-Kulturgefäß auf einem Elektrodenarray in jedem Well ausgesät. Der gesamte Aufbau der ECIS-Anlage wurde von Applied Biophysics, Inc. (Troy, NY 12180) erworben. Die ECIS-Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Joachim Wegener am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster durchgeführt. Es wurde bei Frequenzen von 400 Hz und 40 kHz gemessen und sowohl die Kapazität, als auch die Impedanz nach Inkubationszeiten von 0–4000 min ermittelt. Der Stromfluss durch einen Zellmonolayer auf einer Goldelektrode (Durchmesser: 250 µm) ist hier die entscheidende Messgröße. Die bei 40 kHz gemessene Kapazität ist hoch bei einer unvollständig bedeckten Elektrode, zum Beispiel bei nicht ganz gespreiteten Zellen. Bei einer angelegten Frequenz von 40 kHz sinkt die gemessene Kapazität quasi linear mit fortschreitender Zellspreitung, die Kapazität kann also bei dieser Frequenz als direktes Maß der Zellproliferation und –spreitung auf der Elektrodenoberfläche angenommen werden. Sobald die Elektrode komplett mit einem konfluenten Monolayer belegt ist, sinkt die Kapazität unter einen Wert von 10 nF und der resultierende Widerstand steigt entsprechend. Der Widerstand bei 400 Hz reflektiert die Summe des Widerstandes, der aus dem Zell-Substrat-Kontakt resultiert und dem der durch die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten auftritt. Man kann durch den Vergleich von Kapazität und Widerstand das Wachstum bzw. die Schädigung einer Zellkultur verfolgen. Werden die Membranen permeabilisiert, verhalten sich die Zellen nicht mehr wie Isolatorpartikel und der Widerstand bricht zusammen bzw. die Kapazität nimmt Werte an, wie man sie für eine leere Elektrode findet (Wegener et al., 2000).



## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Auswahl geeigneter Zelllinien

Da die Untersuchungen an Zellen insbesondere die Membranpassage von Agrostin betreffen, musste bei der Auswahl des Zellmaterials insbesondere auf den Gesichtspunkt der Zellmembranintegrität und deren Barrierefunktion Wert gelegt werden. Generell sind die verwendeten drei Zelllinien unterschiedlicher Herkunft und unterscheiden sich in ihren Eigenschaften:

#### 3.1.1 ECV 304 (hauptsächlich verwendete Zelllinie; ATCC Nr. ACC 310)

Die Zelllinie ECV-304 (Hughes, 1996; Takahashi et al., 1990) wurde 1984 aus der Nabelschnurvene eines neugeborenen japanischen Jungen gewonnen (Abb. 3-2 u. 3-20). Die Zellen wurden lange Zeit für Endothelzellen gehalten, genauere Analysen haben jedoch gezeigt, dass es sich hierbei eigentlich um ein Derivat der humanen Harnblasen-Karzinom-Zelllinie T-24 handelt (Bubenik et al., 1973; Dirks et al., 1999). ECV- Zellen haben ein hohes proliferatives Potential auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren. Es handelt sich um adhärente Zellen mit einem pflastersteinartigen einschichtigen Wachstum: in der Phasenkontrastmikroskopie erscheinen ECV 304-Zellen flach mit einer endothelialen Morphologie. Sie bilden dichte konfluente Monolayer ohne erkennbare Lücken. Die endotheltypischen Proteine Thrombomodulin, ICAM, VCAM, CD 51 und Vimentin konnten bereits in ECV 304-Zellen nachgewiesen werden. Sie besitzen ein dichtes Netz subplasmalemmaler Aktinfilamente in Kolokalisation mit Cadherinen und stress-fibers, sie nehmen acetyliertes LDL über den scavenger Rezeptor intrazellulär auf und setzen Endothelin, PAI-1 und VEGF frei. Sie exprimieren jedoch das epitheliale E-Cadherin, während ihnen das endotheliale VE-Cadherin fehlt, sie haben die Fähigkeit zur polaren Proteinexpression und reagieren auf Calciumentzug mit EGTA mit einer (reversiblen) Öffnung der Zellkontakte. Sie bilden Maculae adherentes (Desmosomen) mit den epitheltypischen Zytokeratinen 8 und 18, allerdings sind sie nicht wie bei Epithelzelllinien Bestandteil geordneter Kontaktkomplexe in direkter, morphologisch-funktioneller Beziehung zu den Zonulae occludentes (tight junctions).

### **3.1.2 HaCat (für den Amidoschwarz-Assay verwendete Zelllinie)**

Adulte immortalisierte humane Keratinocyten-Zelllinie: Diese Zelllinie besitzt den von allen bekannten epidermalen Zelllinien den höchsten Differenzierungsgrad. Dieser wird als Indikator für eine Ausbildung biotransformierender Enzyme angesehen. Die Zellen entstammen ursprünglich einer histologisch normalen Gewebeprobe eines Melanompatienten. Die heute verwendete Zelllinie verdankt ihre Etablierung unter anderem dem Einsatz eines Nährmediums mit geringem Calciumgehalt und einer leicht erhöhten Inkubationstemperatur. In ihrer Initialphase ist die Entwicklung der HaCaT-Zellen sehr stark von Calciumkonzentration und Temperatur abhängig, nach ca. zehn Passagen sind sie relativ unempfindlich gegenüber veränderten Wachstumsbedingungen. Die Zelllinie ist aus diesem Grund und wegen ihrer gleichbleibenden Replikations- und Proliferationsraten einfach zu handhaben (Boukamp et al., 1988).

### **3.1.3 SK-N-SH (Vergleichszelllinie für ECV 304, ATCC Nr. HTB 11)**

Diese Zelllinie ist eine immortalisierte humane Neuroblastom-Zelllinie, gewonnen aus den Knochenmarksmetastasen eines vierjährigen Mädchens und diente als Vergleichszelllinie neben der ECV 304-Zelllinie.

## **3.2 Zytotoxizitätsassays**

In einem Zytotoxizitätstest kann die Wirkung eines Toxins auf einen Zellverband bestimmt werden. In der Regel wird auf unterschiedliche Weise die Zellproliferation gemessen und aus diesen Daten das Ausmaß der Toxizität bestimmt. Während für die Zellzählung mit dem CASY-Zellzählgerät die Stoffwechselaktivität der Zellen keine Voraussetzung darstellt, ist sie entscheidend für den MTT-Test. Zur Etablierung einer optimierten Bestimmungsmethode wurden die in den folgenden Abschnitten dargestellten Parameter berücksichtigt.

### **3.2.1 Bestimmung der Inkubationszeit**

Nach ca. 16 h Inkubationszeit im Brutschrank waren die Zellen adhärent. Es waren mindestens drei Verdoppelungen innerhalb einer Inkubationszeit von 72 h möglich (die

Verdoppelungszeit beträgt ca. 24 h nach initialer *lag*-Phase). Nach einer Wachstumsphase von 24 h, sowie einer Inkubationszeit von 72 h nach Zugabe des Toxins (20 µl/ well) wurde die Zytotoxizitätsmessung durchgeführt. Die MTT-Konzentration wurde so eingestellt, dass nach einer Inkubationszeit von 2 h die Extinktion der 100%-Kontrolle < 1.0 war. Nach Optimierung dieser Parameter wurde anhand einer Eichgerade die Beziehung zwischen der Zellzahl und der daraus resultierenden Absorption ermittelt.

### 3.2.2 Definition der Zelldichte

Um den Zellen zur Zytotoxizitätsmessung während der Inkubationszeit eine ausreichende Wachstumskapazität zu gewährleisten, wurde in allen Experimenten eine Ausgangszelldichte von  $5 \cdot 10^3$  Zellen/ well ( $V_{[\text{Medium}]} = 100 \mu\text{l}$ ) gewählt. Für eine hohe Durchsatzrate wurden die beschriebenen Assays in 96 well-Platten durchgeführt; die gewünschte Zelldichte wurde in einem Volumen von 100 µl Kulturmedium ausgesät. Eine optimierte Zellzahl pro well ist Voraussetzung für reproduzierbare Messergebnisse, da es bei einer zu gering ausgesäten Zellzahl zu einer Bildung von Plaques bzw. Inseln kommt und die erforderliche Konfluenz der Zellen nicht gewährleistet werden kann. Eine zu hohe Zelldichte führt ebenfalls zu einer verminderten Messqualität, da der Boden des wells zu schnell bedeckt ist und man zum Messzeitpunkt nicht mehr von einem Monolayer ausgehen kann. Zusätzlich kann es bei der Messung mit dem CASY-Zellzählgerät zur Bildung von störenden Zellaggregaten kommen, die die Homogenität der Zellsuspension verringern und dadurch den Durchfluss durch die Messkapillare erschweren.

### 3.2.3 Einfluss der Zelllinie

Da jede Zelllinie andere Eigenschaften besitzt, musste bei jeder Messung mit dem CASY-Zellzählgerät darauf Rücksicht genommen werden. Eine optimale Zellgrößenverteilung entsprechend einer Gaußschen Normalverteilung ergäbe einen klar definierbaren Messbereich. Unterschiedliche Zellgrößenverteilungen erfordern jedoch eine Anpassung durch eine individuell einstellbaren Cursorfunktion. Hier besteht ein Vorteil der MTT-Methode darin, dass lediglich die metabolisierenden, also lebenden Zellen erfasst werden. Zusätzlich musste insbesondere bei ECV-Zellen die Vereinzelung sehr schonend verlaufen, da sie sehr empfindlich auf mechanische Einflüsse reagieren. Die zu messenden Zellen wurden

unter standardisierten Bedingungen abgelöst, in der Messlösung suspendiert und vor jeder Messung gleichmäßig verteilt. Jede Zellzählung wurde als Dreifachmessung durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

### 3.3 Einfluss von DMSO auf die Zytotoxizität

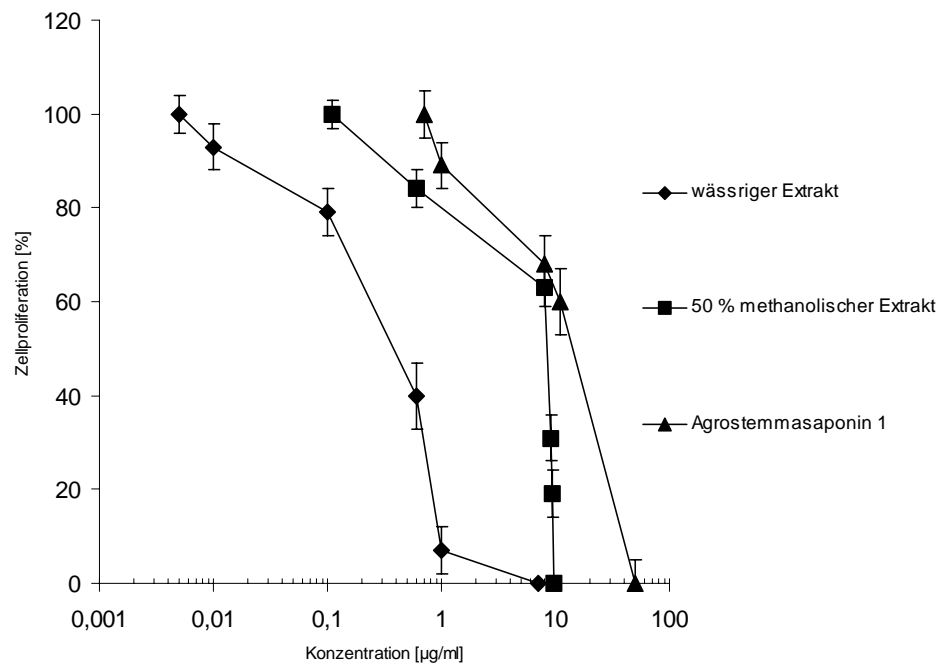
Um eine mögliche Beeinflussung von DMSO (insbesondere als Lösungsmittel für verschiedene Triterpensaponine verwendet) auf das Ergebnis der Zytotoxizitätsmessung bzw. auf die Zellkultur ausschließen zu können, wurde eine Untersuchung der Zytotoxizität von DMSO auf ECV 304-Zellen durchgeführt (siehe Tab. 3-1). Es wurden fünf DMSO-Konzentrationen gewählt und nach Auswertung der Ergebnisse eine Obergrenze von 0.1 % DMSO festgelegt.

**Tab. 3-1:** Einfluss von DMSO auf die Zellproliferation (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3)

Konzentration DMSO [%]	0.0	0.1	0.5	0.75	1.0
Zellproliferation [%]	100.0 $\pm$ 0.35	97.1 $\pm$ 1.21	78.3 $\pm$ 0.48	64.9 $\pm$ 0.37	53.2 $\pm$ 0.46

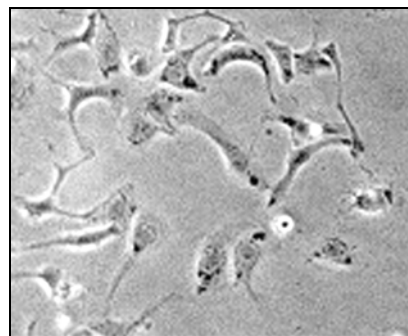
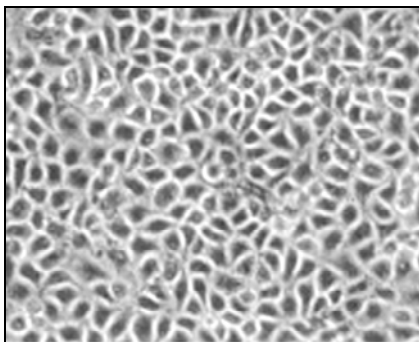
Methode: MTT-Assay  
Ausgangszellzahl:  $10^3$  Zellen/Well  
Inkubationszeit: 72 h  
Zelllinie: ECV 304

### 3.4 Zytotoxizität von Agrostemma-Rohextrakten



**Abb. 3-1:** Zytotoxizität eines wässrigen, eines methanolisch-wässrigen (50 %) Extraktes und des Hauptsaponins (AS 1) der Kornrade (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3).

Methode: MTT-Assay  
 Ausgangszellzahl:  $5 \times 10^3$  Zellen/Well (24 well-Platte)  
 Inkubationszeit: 72 h  
 Zelllinie: ECV 304



a) Monolayer einer intakten ECV 304-Zell- b) ECV 304-Zellen nach Inkubation (72 h) des  
 linie (72 h Proliferationszeit) Agrostemma-Samenextraktes (4 µg/ml)

**Abb. 3-2:** Morphologische Veränderungen der ECV 304-Zelllinie nach Extraktinkubation

Ausgangspunkt der Zytotoxizitätsuntersuchungen des Samenmaterials von *Agrostemma githago* L. war die Beobachtung, dass die Zytotoxizität eines wässrigen Kornradesamenextraktes ( $IC_{50}$   $0.3 \pm 0.1$   $\mu\text{g/ml}$ ) die eines methanolisch-wässrigen ( $IC_{50}$   $6.5 \pm 1.1$   $\mu\text{g/ml}$ ) Extraktes und die der reinen Agrostemmasaponine ( $IC_{50}$  [AS 1]  $6.4 \pm 1.5$   $\mu\text{M}$  bzw.  $10.1 \pm 2.35$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $IC_{50}$  [AS 2]  $6.2 \pm 1.5$   $\mu\text{M}$  bzw.  $10.5 \pm 2.55$   $\mu\text{g/ml}$ ) deutlich übertraf. Aufgrund dieser Ergebnisse (siehe Abb. 3-1) wurde das Samenmaterial im weiteren Verlauf der Untersuchungen insbesondere hinsichtlich weiterer wasserlöslicher Verbindungen neben den Saponinen untersucht. Zur Klärung der Ursache dieser hohen Toxizität des wässrigen Extraktes wird im Folgenden die Isolation des Toxins, sowie das toxische Prinzip des Samenmaterials anhand verschiedener Trennmethoden und Darstellungsverfahren bearbeitet und, soweit möglich, geklärt.

### 3.5 Isolierung aktiver Agrostemma-Fractionen

#### 3.5.1 Fraktionierung durch Größenausschluss-Membranfiltration

Durch die Molekülsiebfiltration ließ sich der wässrige Extrakt in Fraktionen (je 400  $\mu\text{l}$ /Filtereinheit) definierter Molekülgrößenbereiche aufreinigen.

Folgende Filtereinheiten fanden Verwendung:

1. NMWL (nominal molecular weight limit) 5 kDa; 400  $\mu\text{l}$
2. NMWL (nominal molecular weight limit) 10 kDa; 400  $\mu\text{l}$
3. NMWL (nominal molecular weight limit) 30 kDa; 400  $\mu\text{l}$
4. NMWL (nominal molecular weight limit) 100 kDa; 400  $\mu\text{l}$

**Tab. 3-2:**  $IC_{50}$ -Werte von Fraktionen der Mikrozentrifugenfiltration

Proteinfraktion ( $M_r$ entsprechend der Ausschlussgrenze einer Membraneinheit)	$IC_{50}$
< 5.0 kDa	> 15.0 $\mu\text{g/ml}$
< 10.0 kDa	> 15.0 $\mu\text{g/ml}$
< 30.0 kDa	$0.3 \pm 0.1$ $\mu\text{g/ml}$
< 100.0 kDa	$0.4 \pm 0.1$ $\mu\text{g/ml}$
wässriger Extrakt aus <i>Agrostemma githago</i> L.	$0.3 \pm 0.1$ $\mu\text{g/ml}$

(Mittelwert  $\pm$  SD, n=3)

Methode:	MTT-Assay
Ausgangszellzahl:	$5 \times 10^3$ Zellen/Well (24 well-Platte)
Inkubationszeit:	72 h
Zelllinie:	ECV 304

Neben der Fraktionierung entsprechend der relativen Molekülmasse der Inhaltsstoffe verschiedener Fraktionen konnte mit dieser Methode durch eine begleitende Zytotoxizitätsmessung (Tab. 3-2) und SDS-PAGE vom Proteinmuster der toxischen Fraktionen auf deren Beitrag zur Toxizität zurückgeschlossen werden. Nach Auswertung dieser Ergebnisse lag die Vermutung nahe, dass wasserlösliche Substanzen, vermutlich Proteine, mit einer Masse über 10.0 kDa verantwortlich für die Toxizität sind. Reine, definierte Proteinfractionen wurden in den folgenden Schritten isoliert und hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht (siehe Abschnitt 3.5.2 u. 3.5.3).

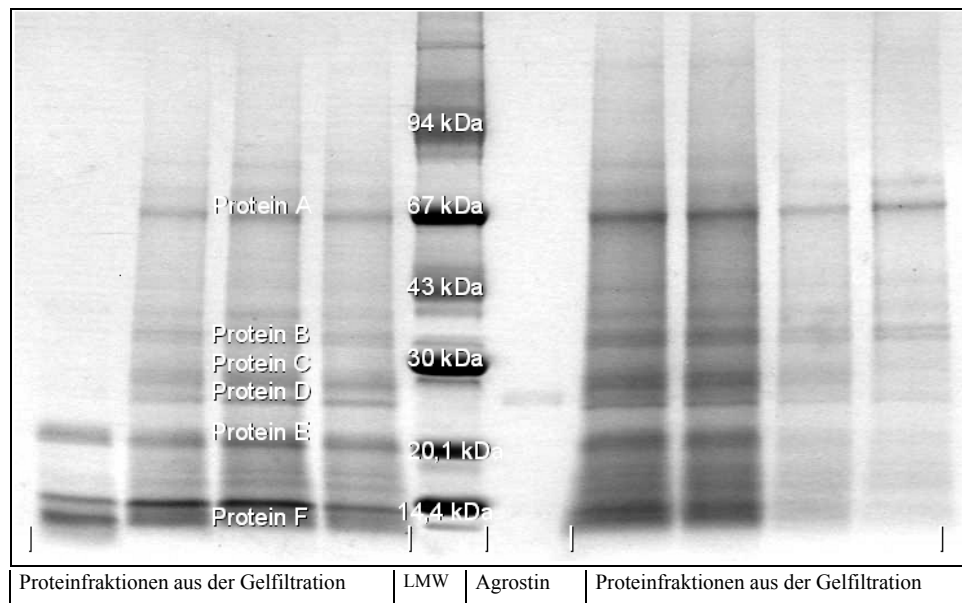
### 3.5.2 Proteinfractionierung durch Ammoniumsulfatfällung

Erste Proteinfractionen wurden durch Ammoniumsulfatfällung isoliert. Die Protein/ Agrostin enthaltenden Fraktionen wurden durch UV- Spektroskopie ( $A_{280}$ ) und SDS-PAGE (siehe Abb. 3-3 und 3-4) identifiziert (Stirpe, 1983). Durch Kontrolle der Effektivität der durchgeführten Reinigungsschritte (Zentrifugation und Dialyse mit 6.1 %  $\text{BaCl}_2$  [m/v]) konnte eine Verunreinigung der Extrakte mit Sulfatresten ausgeschlossen werden. Sämtliche aufgereinigte Fraktionen aus der Ammoniumsulfatfällung zeigten eine äußerst geringe Zytotoxizität ( $\text{IC}_{50}$  50/ 60/ 70 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > 45.8 \mu\text{g/ml}$ ;  $n = 3$ ). Anschließend wurde eine Gelfiltration der Agrostin enthaltenden Fraktionen mit Sephadex G 75 (MPLC) und eine Kationenaustauschchromatographie zur Isolation des Agrostins durchgeführt.

### 3.5.3 Proteinisolierung durch Gelfiltrationschromatographie

#### 3.5.3.1 MPLC-Proteinisolierung ( Medium Pressure Liquid Chromatography)

Die Gelfiltrationschromatographie mittels MPLC diente der Aufreinigung und der systematischen Fraktionierung des lyophilisierten Materials aus der Ammoniumsulfatfällung. Es kamen Sephadex G 75 (Fraktionierungsspektrum 3-80 kDa) und G 50 (Fraktionierungsspektrum 1.5-30 kDa) zum Einsatz. Die Kalibrierung der Sephadex-Säulen erfolgte durch Cytochrom C (Sigma,  $M_r$  12.4 kDa; zur Gelfiltrationschromatographie).



**Abb. 3-3:** Darstellung der aus der Gelfiltrationschromatographie (Sephadex G 75) gewonnenen Proteinfraktionen (qualitativ gegen LMW-Kit).

Elektrophorese:	Vertikal-2-D-System Mini Protean II
Gelkassette:	BioRad-Fertiggele 10-20 % Tris-Glycin; 10 well
MW-Marker:	low-molecular weight-standard, Pharmacia
Laufzeit:	1.35 h
Laufpuffer:	Tris-Glycin-Laufpuffer
Färbung:	Coomassie blue (7 % in AcOH); 30 min

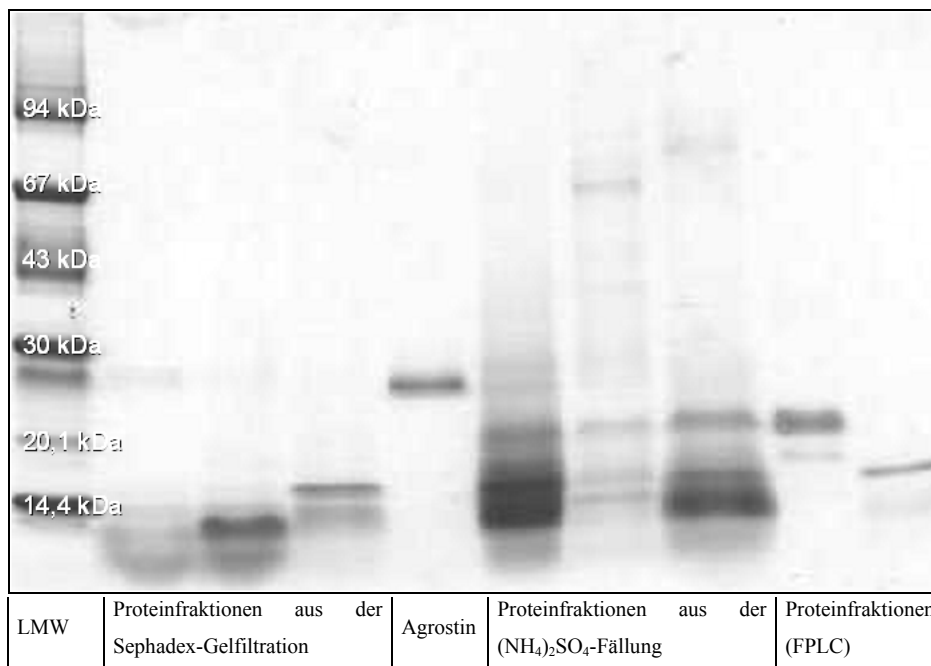
Anhand der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden sämtliche Proteine klassifiziert. Ein LMW (low molecular weight)-Calibration Kit diente der Ermittlung einer Kalibriergerade zur Proteingrößenbestimmung (De Klerk & Engelen, 1985). Jede der dargestellten Proteinfraktionen wurde mittels Bradford-Assay (Proteingehalt der Fraktionen: 35-60 % [m/m]) quantifiziert und einem Zytotoxizitätsassay unterzogen. Es zeigte sich eine sowohl qualitativ (auch das kommerziell erhältliche Agrostin wurde getestet), als auch quantitativ äußerst geringe Toxizität an ECV 304 Zellen ( $IC_{50}$  beider Agrostinuntersuchungen  $> 50.0 \mu\text{g/ml}$ ;  $n = 3$ ).

### 3.5.3.2 FPLC-Proteinisolierung (Fast-Protein Liquid Chromatography)

Aufgrund der Ergebnisse der Mikrozentrifugenfiltration wurde versucht, die in der Elektrophorese erscheinenden Proteine der toxischen Fraktionen mit einer relativen Molekülmasse unter 30.0 kDa chromatographisch zu trennen. Hierzu wurde am FMP (Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) eine FPLC Fast-Protein-Liquid-Chromatography) durchgeführt. Die FPLC diente dazu, neben dem Agrostin (27.0 kDa)



andere Proteinfractionen eines Molekulargewichtes unter 30.0 kDa zu isolieren und aufzureinigen, um die aus der Molekülsiebfiltration erhaltenen Toxizitätswerte eingehender untersuchen zu können. Es wurden zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 23.0 kDa (Proteinfraction E) und 15.0 kDa (Proteinfraction F; Abb. 3-3) isoliert und lyophilisiert. Nach Dialyse, Lyophilisierung und Quantifizierung der in den Fraktionen elektrophoretisch detektierten Proteine wurde ihre Toxizität getestet.



**Abb. 3-4:** Darstellung der aus der Gelfiltrationschromatographie (Sephadex; FPLC: HiLoad Superdex 75) und der Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Proteinfractionen und des Agrostins (Kationenaustauschchromatographie, CM-Cellulose; qualitativ gegen LMW-Kit).

Elektrophorese:	Vertikal-2-D-System Mini Protean II
Gelkassette:	BioRad-Fertiggele 10-20 % Tris-Glycin; 10 well
MW-Marker:	low-molecular weight-standard, Pharmacia
Laufzeit:	1.35 h
Laufpuffer:	Tris-Glycin-Laufpuffer
Färbung:	Coomassie blue (7 % in AcOH); 30 min

Sechs deutlich erkennbare Proteinfractionen wurden ausgemessen:

1. Protein A: 67.5 kDa\*
2. Protein B: 32 kDa\*
3. Protein C: 29 kDa\*
4. Protein D: 27 kDa\* = Agrostin\*\*
5. Protein E: 23 kDa\*
6. Protein F: 15 kDa\*

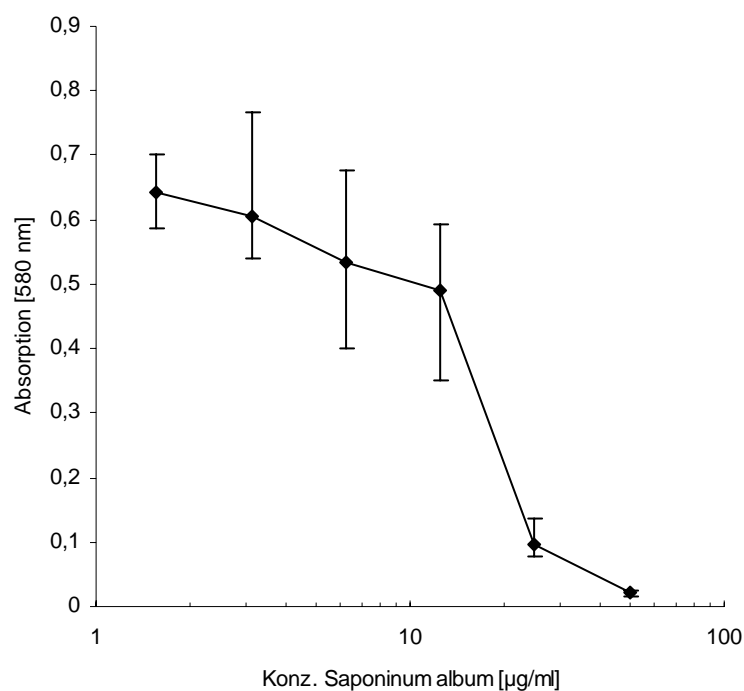
\*Alle Molekulargewichtsangaben entsprechen dem Ergebnis aus der Bandenlage im Vergleich mit dem LMW-Standard. Sie sind keine exakten Molekulargewichtsbestimmungen.

\*\*Das Agrostin, ein Glykoprotein, war die einzige als Reinsubstanz erhältliche Substanz.

Die untersuchten Extrakte zeigten eine starke Zytotoxizität, wenn elektrophoretisch ein bestimmtes dargestelltes Proteinmuster und Saponin per DC nachgewiesen werden konnte ( $IC_{50}$   $0.1-0.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ ;  $n = 3$ ; Abb. 3-3). Proteine, die in Kombination mit dem Agrostemma-Saponingemisch toxisch wirkten, würden entsprechend der Ergebnisse aus der Größenausschluss-Membranfiltration in einem Größenbereich über 10 kDa liegen (Tab. 3-2). Mit Hilfe einer systematischen elektrophoretischen Darstellung der durch die Gelfiltrationschromatographie und die FPLC isolierten Proteine konnte Agrostin als das für die Toxizität entscheidende Protein identifiziert werden (Abb. 3-4).

### 3.6 Zytotoxizitätsuntersuchungen an Isolationsprodukten aus Agrostemma

#### 3.6.1 Ermittlung der $IC_{50}$ von Saponinum album



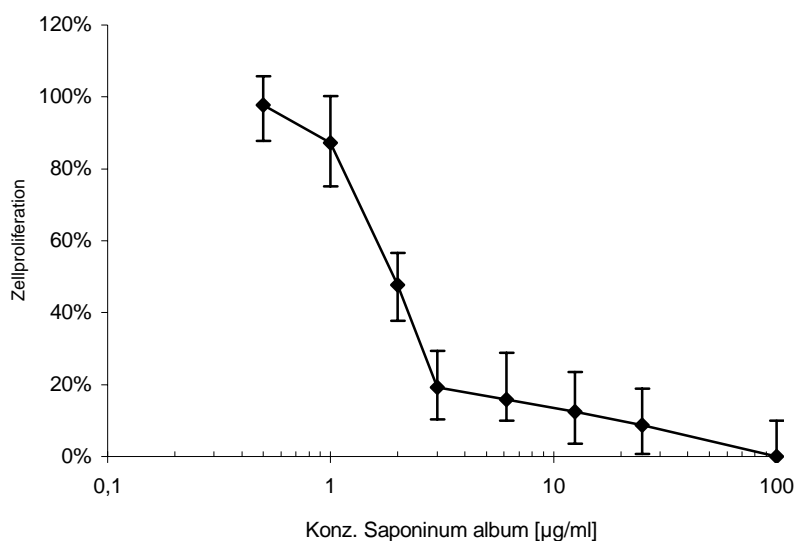
**Abb. 3-5:** Untersuchung der Zytotoxizität und Ermittlung der  $IC_{50}$  von Saponinum album aus *Gypsophila paniculata* (Merck) an ECV 304-Zellen (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ ).

Methode:	MTT-Assay (Messung bei 580 nm)
Ausgangszellzahl:	$10^3$ Zellen/Well
Inkubationszeit:	72 h
Zelllinie:	ECV 304

Anhand der Werte wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt, die zu einer  $IC_{50}$  (Saponinum album) von 13.14  $\mu\text{g/ml}$  führte.

Aufgrund der ermittelten  $IC_{50}$  wurde mit einer Festlegung der Saponinum album-Konzentration auf 3.0  $\mu\text{g/ml}$  bei allen weiteren Untersuchungen eine mögliche Toxizität oder eine Beeinflussung der Zellintegrität ausgeschlossen (siehe Abb. 3-5).

### 3.6.2 Bestimmung der Zytotoxizität von Saponinen bei konstanter Agrostinkonzentration



**Abb. 3-6:** Untersuchung der Zytotoxizität von Saponinum album bei konstanter Agrostinkonzentration [30 ng/ml].

Methode: MTT-Assay  
 Ausgangszellzahl:  $10^3$  Zellen/Well  
 Inkubationszeit: 72 h  
 Zelllinie: ECV 304

(U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert  $\pm$  SD;  $n=3$ ;  $p<0.05$ )

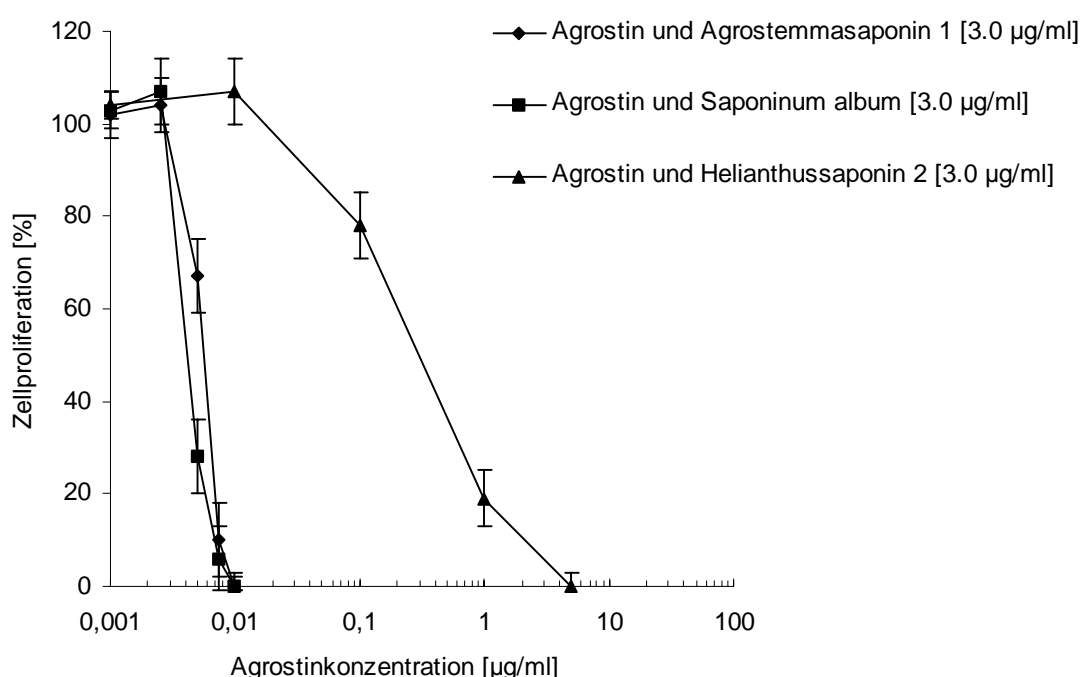
Nach linearer Regression ergibt sich der Wert für die  $IC_{50}$  wie folgt:

Saponinum album [3.0 $\mu\text{g/ml}$ ] und Agrostin [30 ng/ml]	$y = -0.3395x + 1.193$ $R^2 = 0.9912$	$IC_{50}$ : 2.04 $\mu\text{g/ml}$
--	--	-----------------------------------

Die  $IC_{50}$  für Saponinum album mit gleichzeitiger Agrostininkubation lag bei ca. 2.0  $\mu\text{g/ml}$ , die  $IC_{80}$  dieses Rohsaponingemisches bei gleichzeitiger Agrostininkubation lag bei 3.0  $\mu\text{g/ml}$  Saponinum album (siehe Abb. 3-6).

Die Bestimmung der  $IC_{50}$  von Saponinum album bei konstanter Agrostinkonzentration diente der Optimierung der einzusetzenden Saponinkonzentration, da in diesem Diagramm die Grenzkonzentration des zur Zytotoxizität führenden Saponins bestimmt wird. Bei verwendeter Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  Saponin ( $IC_{50}$  Saponinum album > 11  $\mu\text{g/ml}$ ) kann eine Eigentoxizität ausgeschlossen, sowie eine ausreichende Aktivität gewährleistet werden.

### 3.6.3 Zytotoxizitätsuntersuchung von Agrostin mit unterschiedlichen Saponinen



**Abb. 3-7:** Untersuchung der Zytotoxizität und Ermittlung der  $IC_{50}$  von Agrostin mit konstanten Konzentrationen (3.0  $\mu\text{g/ml}$ ) von Saponinum album, Helianthussaponin 2 und Agrostemmasaponin 1 (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ ). Aus diesen Daten wurden  $IC_{50}$ -Werte für Agrostin mit den jeweiligen Saponinen ermittelt (siehe Tab. 3.3).

Methode: MTT-Assay  
 Ausgangszellzahl:  $10^3$  Zellen/Well  
 Inkubationszeit: 72 h  
 Zelllinie: ECV 304

**Tab. 3-3:** Darstellung der  $IC_{50}$ -Werte von Agrostin mit Saponinen (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ )

Agrostin und Agrostem-	$y = -13126x + 124.85$	$IC_{50}$ : $5.7 \pm 1.7$ ng/ml
------------------------	------------------------	---------------------------------

masaponin 1 <sup>a</sup>	$R^2 = 0.9379$	
Agrostin und Saponinum album <sup>a</sup>	$y = -13383x + 118.39$ $R^2 = 0.8701$	IC <sub>50</sub> : $5.1 \pm 1.5$ ng/ml
Agrostin und Helianthus-saponin 2 <sup>a</sup>	$y = -13,587\ln(x) + 28.43$ $R^2 = 0.8915$	IC <sub>50</sub> : $204 \pm 90$ ng/ml

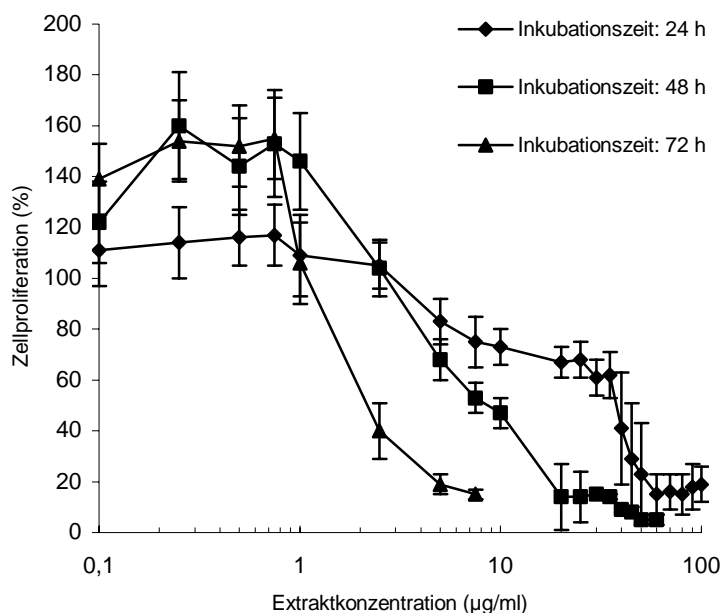
<sup>a</sup> Saponinkonzentration 3.0 µg/ml (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert  $\pm$  SD; n = 3; p < 0.05)

Durch lineare Regression konnten die IC<sub>50</sub>-Werte des Agrostitins bei gleichzeitiger Gabe der erwähnten Saponine bestimmt werden. Die IC<sub>50</sub> des Agrostitins, eines Ribosomen-Inaktivierenden Proteins vom Typ I, lag bei über  $1.8 \cdot 10^3$  mM, da es aufgrund seiner strukturellen Voraussetzungen nicht zu einer Zellmembrandurchdringung befähigt ist. Es besteht lediglich aus einem Effektomer, das über keine zweite Kette wie z.B. Ricin und Abrin aus der Gruppe der Typ II-RIPs verfügt. Dementsprechend konnte für dieses Toxin keine IC<sub>50</sub> ermittelt werden. Sobald eine subtoxische Konzentration des nativen Agrostemmasaponins oder des ebenfalls aktiven Saponinum album (jeweils 3.0 µg/ml) inkubiert wurde, konnte ein Toxizitätssprung auf  $2.1 \cdot 10^{-7}$  mM Agrostin (entspr. 5.7 ng/ml Agrostin und 3.0 µg/ml Agrostemmasaponin 1), bzw.  $1.9 \cdot 10^{-7}$  mM Agrostin (entspr. 5.1 ng/ml Agrostin und 3.0 µg/ml Saponinum album) festgestellt werden. Helianthussaponin 2, ein ebenfalls triterpenoides Bisdesmosid mit ähnlichem Molekulargewicht und Echinocystsäure als Aglykon (siehe Tab. 2-1), zeigte eine wesentlich geringere Toxizität mit einer IC<sub>50</sub>[Agrostin] von 0.2 µg/ml.

Die für Agrostin in Kombination mit Agrostemmasaponin 1 (3.0 µg/ml) ermittelte IC<sub>50</sub> von 5.7 ng/ml (Abb. 3-7, Tab. 3-3) liegt in der Größenordnung der im Retikulozytenlysattest ermittelten IC<sub>50</sub> von 0.018 µg/ml (Stirpe et al., 1983). Die hämolytischen Indices der inkubierten Saponine, welche über eine erhöhte Oberflächenaktivität die Zellwandpermeabilität erhöhen, korrelieren nicht mit der ermittelten Toxizität, auch die Eigentoxizität der Saponine ist zu gering, um eine Erklärung der ermittelten Toxizität zu liefern (Seeman, 1974). Auf der Basis der vorgestellten Ergebnisse wird in dieser Arbeit die These einer kooperativen Toxizität zwischen Agrostin und dem sauren, bisdesmosidischen Agrostemmasaponin postuliert (Hebestreit & Melzig, 2003).

### 3.7 Untersuchungen zur Spezifität der Wirkung von Agrostin und Saponin

#### 3.7.1 Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus an HaCat-Zellen



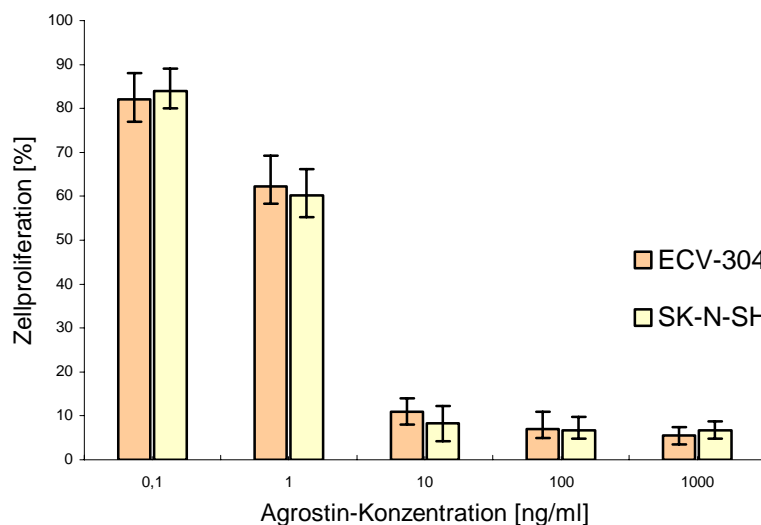
**Abb. 3-8:** Einfluss der Inkubationszeit eines wässrigen Agrostemma-Samenextraktes auf die Zellproliferation von HaCat-Zellen (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ ). Untersuchte Agrostemmaextrakt-konzentrationen: 0.1-100  $\mu\text{g/ml}$ .

Methode:	Amidoschwarz-Assay
Ausgangszellzahl:	$5 \times 10^3$ Zellen/Well
Inkubationszeit:	24 h/ 48 h/ 72 h
Zelllinie:	HaCat-Keratinocyten

Erste Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus wurden an HaCat-Zellen mit Hilfe des Amidoschwarz-Assays durchgeführt (Abb. 3-8). Verschiedene Extraktkonzentrationen (0.1-100  $\mu\text{g/ml}$ ) wurden über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 h inkubiert und hinsichtlich der Auswirkung auf die Zellproliferation untersucht. Am Verlauf der Wachstumshemmung wurde deutlich, dass kein plötzlicher Zelltod, wie er bei toxisch wirkenden Saponinkonzentrationen aufgrund einer Lyse der Zellmembran auftritt, festzustellen war (siehe Abb. 3-24), sondern eine Toxizität, welche von der Inkubationsdauer abhängig war und nach ca. 72 h ihr Maximum erreichte (siehe Abb. 3-25). Alle weiteren Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden

aufgrund dieser Ergebnisse mit einer Inkubationszeit von 72 h durchgeführt. Extraktkonzentrationen  $>20 \mu\text{g/ml}$  zeigten eine Kinetik, die vermutlich einer erhöhten, toxischen Saponinkonzentration zuzuschreiben ist. Die ECIS-Methode, deren Ergebnisse diese Untersuchungen bestätigen und die Kinetik der toxischen Wirkung beschreibt, wird in den Abschnitten 2.19 und 3.13 vorgestellt.

### 3.7.2 Vergleich der Zytotoxizität von Agrostin an ECV 304- und SK-N-SH-Zellen



**Abb. 3-9:** Untersuchung der Zytotoxizität von Agrostin (Konz.: 0.1; 1.0; 10.0; 100.0; 1000.0 ng/ml) und Saponinum album (Konz.:  $3.0 \mu\text{g/ml}$ ) an ECV 304- und SK-N-SH-Zellen.

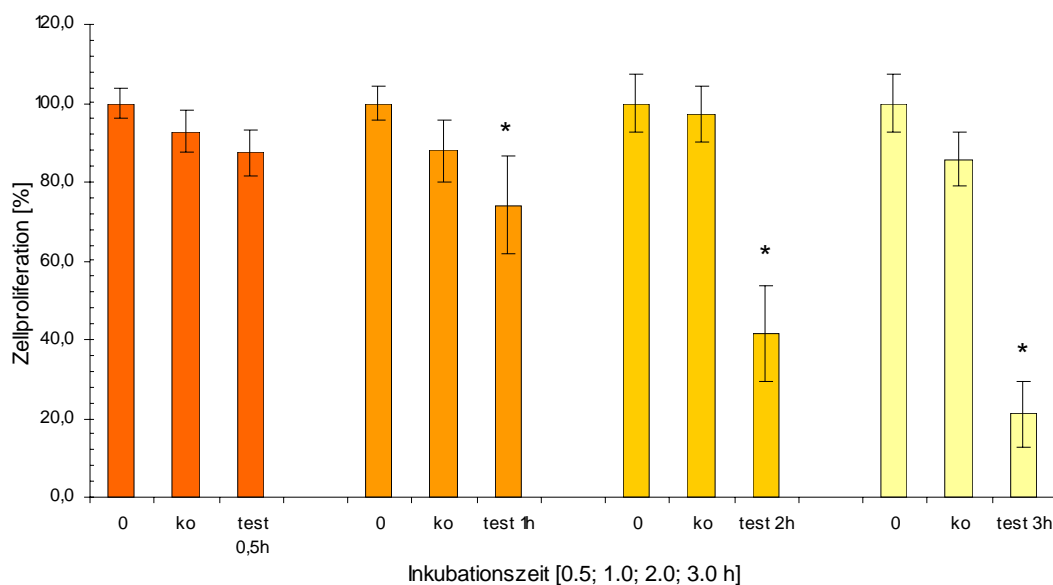
Methode: MTT-Assay  
 Ausgangszellzahl:  $10^3$  Zellen/Well  
 Inkubationszeit: 72 h  
 Zelllinie: SK-N-SH/ ECV 304

(U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ ;  $p < 0.05$ ; keine signifikanten Zytotoxizitätsunterschiede der beiden Zelllinien)

Um einen Vergleich mit unterschiedlichen Zellkulturen herstellen zu können, wurde eine Neuroblastomzelllinie (SK-N-SH) herangezogen und unter identischen Bedingungen hinsichtlich ihres Verhaltens auf unterschiedliche Agrostinkonzentrationen (0.1 ng-1.0  $\mu\text{g}$ ) bei konstanter Saponinum album-Konzentration untersucht. Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellviabilität festgestellt werden. Somit konnte ein hochspezifischer Mechanismus bezüglich der Toxinaufnahme bei lediglich einer Zellart wie der ECV-304 Zelllinie ausgeschlossen werden (siehe Abb. 3-9).

### 3.7.3 Getriggerte Toxizität

Die Möglichkeit einer getriggerten Toxizität wurde an ECV-304 Zellen untersucht: Saponinvorkubation (5 min, 3.0 µg/ml) und anschließende Agrostininkubation (1.0 µg/ml). Das Gemisch wurde jeweils nach unterschiedlichen Inkubationszeiten durch Earle's Medium ersetzt. Nach weiteren 72 h wurde Zytotoxizitätstest durchgeführt. Diese Ergebnisse belegen zum einen einen raschen Eintritt des Agrostins in das Zytoplasma (ca. 1 h, siehe auch Immunfluoreszenzmikroskopische Abbildungen, Abschnitt 3.12), sowie einen langsamen Eintritt des toxischen Effektes, der durch die ECIS-Untersuchungen im Gegensatz zu dieser Methodik online und nichtinvasiv bestätigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.13).



**Abb. 3-10:** Getriggerte Zytotoxizität; Präinkubation von Saponinum album (3.0 µg/ml) und nach 5 min Inkubationszeit Zugabe von Agrostin (1.0 µg/ml); Mediumwechsel nach 30 min/ 60 min/ 120 min/ 180 min. Zytotoxizitätsmessung nach 72 h (0: Kontrolle ohne Mediumwechsel; k0: Kontrolle mit Mediumwechsel; test: Messung nach Toxininkubation und Mediumwechsel).

Methode: MTT-Assay  
 Ausgangszellzahl:  $10^3$  Zellen/Well  
 Inkubationszeit: 72 h  
 Zelllinie: ECV 304  
 c [Agrostin] const.: 1.0 µg/ml

(U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert  $\pm$  SD, n=3; p < 0.05; \* signifikant stärkere Zytotoxizität im Vergleich zur Inkubationszeit von 0.5 h )



Für die Entstehung der ermittelten Toxizität können verschiedene Aufnahmemechanismen in Betracht gezogen werden, da es sich um einen schnellen, temperaturabhängigen, kooperativen Mechanismus zwischen einem Toxin und einem offensichtlich Endozytose vermittelnden Saponin handelt, der durch ca. dreistündige Vorinkubation getriggert werden kann (Abb. 3-10) und dessen Kinetik aufgrund der unterbundenen Proteinsynthese bei intakter Zellmembran verzögert abläuft (siehe Abschnitt 3.7.1 und 3.13). Durch die Zugabe eines Saponins könnte die Endozytose, z. B. durch LDL- Rezeptoren ausgelöst werden und dadurch das ribosomeninaktivierende Protein in die Zelle gelangen bzw. in Analogie zu den ISCOMS eine bessere Präsentation des Proteins an der Zelloberfläche ermöglicht werden (Rönnberg et al., 1997).

### **3.8 Struktur-Wirkungsbeziehungen unterschiedlicher Triterpensaponine in Kombination mit RIPs**

Wie bereits dargestellt, konnten sowohl Agrostemma-Saponinfraktionen (siehe Abschnitt 2.18) als auch Gypsophila-Saponinfraktionen durch DC und HPLC isoliert werden (Siepmann, 1998). Zusätzlich wurden unterschiedliche Triterpensaponine mit Gypsogenin oder Quillajasäure als Aglykon, die uns freundlicherweise von Mme Lacaille-Dubois (Université de Bourgogne) zur Verfügung gestellt wurden, getestet (Gaidi, 2000, 2001, 2002; Lacaille-Dubois, 2000). Alle Saponine wurden in MeOH/ DMSO (50 % v/v) angelöst und aliquotiert. Zur Inkubation konnte auf Sterilfiltration verzichtet und die gelösten Saponine direkt im Medium verdünnt werden. Die Endkonzentration DMSO wurde auf max. 0.1 % (v/v) eingestellt. Jeweils 5 min vor der Agrostininkubation wurden die Zellen mit den Saponinen inkubiert. Die untersuchten Triterpensaponine zeigten bei einer konstanten Agrostinkonzentration von 30.0 ng/ml unterschiedliche Aktivitäten. Während die reinen Saponine AsA, AsD, ArjA, ArjC, ArjD, ArjE bei 6.0 µg/ml eine vergleichbare Aktivität wie die Rohsaponingemische Quillajasaponin und Saponinum album (je 3.0 µg/ml) zeigten, sind die Saponine ArjC, ArjD und ArjE auch bei einer Konzentration von 3.0 µg/ml noch so aktiv wie die Rohsaponine bei gleicher Konzentration. AsB, AsE und das monodesmosidische Saponin GoB zeigen eine deutlich geringere Aktivität bei 3.0 und 6.0 µg/ml. Offensichtlich besitzen diejenigen Saponine eine geringere Aktivität, welche monodesmosidisch wie GoB sind oder an Position 3 des Aglykons eine geringe Anzahl bzw. weniger als 3 Zuckerreste aufweisen wie AsE und AsB. Eine Verzweigung der Zuckerkette an Position 28 des Aglykons

scheint nach diesen Ergebnissen keine notwendige Voraussetzung für die Aktivität eines Saponins zu sein. Ob eine Verzweigung der Zuckerkette an Position 3 ebenfalls eine notwendige Voraussetzung für eine synergistische Toxizität darstellt, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht belegt werden (siehe Abb. 3-11).

Die Kombination eines untoxischen Ribosomen-inaktivierenden Proteins wie Agrostin oder Saporin (RIP Typ I) und eines bisdesmosidischen Triterpensaponins mit Gypsogenin oder Quillajasäure als Aglykon erwies sich im Zytotoxizitätstest als ebenso toxisch wie Agrostin im zellfreien System (Retikulozytenlysattest). Das ebenfalls bisdesmosidische Triterpensaponin aus *Helianthus annuus* L. mit Echinocystsäure als Aglykon (fehlende Aldehydfunktion an C<sub>4</sub>) unter identischen Bedingungen zeigte eine wesentlich geringere *in vitro*-Aktivität. Modifikationen der Zuckerkette an Position C<sub>3</sub> des Aglykons haben ebenfalls Auswirkungen auf die Aktivität der Saponine: Monosaccharide an Pos. C<sub>3</sub>, eine fehlende C<sub>3</sub>-Glucuronsäure, Monodesmosidische Saponine und das nach Hydrolyse entstandene Aglykon Gypsogenin zeigten eine signifikant geringere kombinatorische Aktivität.

### 3.8.1 Zytotoxizitätsuntersuchung mit Gypsogenin

Nach der systematischen Untersuchung unterschiedlicher Triterpensaponine erfolgte die Abspaltung der Zuckerketten, bzw. die Darstellung des Aglykons Gypsogenin aus Saponinum album durch saure Hydrolyse. Die Aglyka wurden dünnschichtchromatographisch mit authentischem Material identifiziert und anschließend mit und ohne Zugabe von Agrostin (1.0 µg/ml) durch einen MTT-Test an ECV 304-Zellen auf zytotoxische Aktivität überprüft. Es wurde auch eine Vorinkubation des Aglykons mit Agrostin bei 37°C durchgeführt und auf Zytotoxizität überprüft. Unter diesen Bedingungen und in den getesteten Konzentrationen (bis 25 µg/ml Gypsogenin) konnte für das Aglykon weder eine Eigentoxizität noch eine Toxizität in Kombination mit Agrostin (1.0 µg/ml) festgestellt werden: Agrostin und das durch saure Hydrolyse gewonnene Gypsogenin (3.0-8.0 µg/ml) führten zu keiner ausgeprägten Zytotoxizität (IC<sub>50</sub> (Gypsogenin mit/ ohne Agrostin) > 25.3 µg/ml; n = 3). Die Untersuchung der nach Siepmann et al. durch HPLC isolierten Agrostemma-Saponin-Fraktion bestätigte das Ergebnis hinsichtlich einer aktiven Saponinkomponente mit Gypsogenin als Aglykon (DC-Kontrolle mit authentischem Material: Astrantiagenin D = Gypsogenin; Hiller et al., 1973). Im nächsten Schritt wurde die Untersuchung einer Kombination aus dem Ribosomen-inaktivierenden Protein Agrostin und Agrostemmasaponin 1 sowie Helianthussaponin 2 (Helianthosid) durchgeführt (siehe Abb. 3-7).

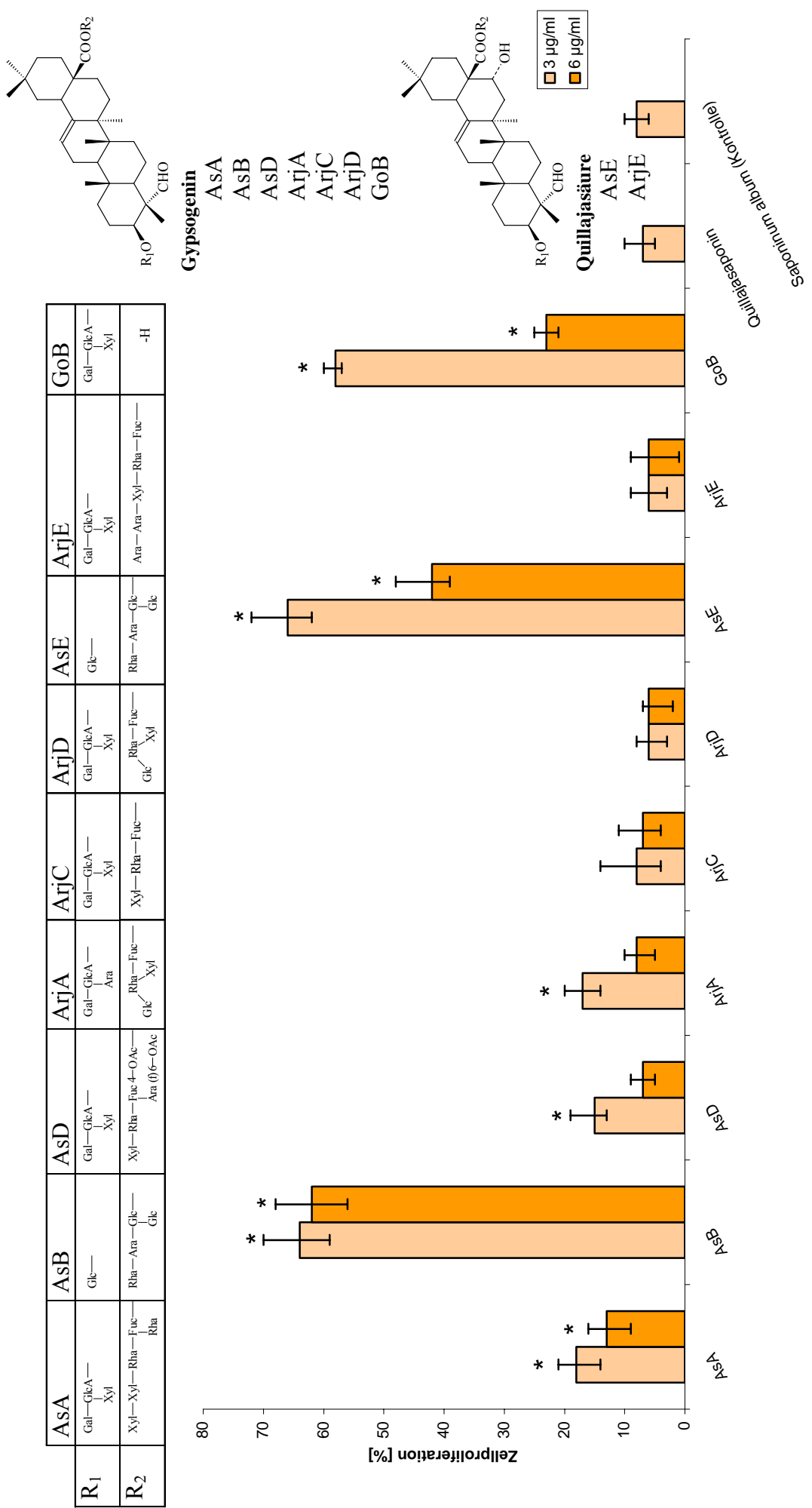


Abb. 3-11: Zytotoxizität von verschiedenen Triterpensaponinen (3.0/ 6.0 µg/ml) und Agrostin (30 ng/ml); nähere Erläuterungen umseitig

Methode:	MTT-Assay
Ausgangszellzahl:	10 <sup>3</sup> Zellen/Well
Inkubationszeit:	72 h
Zelllinie:	ECV 304

(U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert  $\pm$  SD, n=3;  $p < 0.05$ ; \* signifikant geringere Zytotoxizität als die Kombination von Agrostin (30 ng/ml) mit der Saponinum album-Kontrolle bei einer Konzentration von 3  $\mu$ g/ml)

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gypsophila-, Arenaria-, Acanthophyllum- und Agrostemma-Saponine entstammen der Familie der Caryophyllaceae und weisen bestimmte zur Aktivität notwendige Charakteristika auf, die sie gleichfalls für eine Aktivität als Immunadjuvantien benötigen: saure triterpenoide Bisdesmoside mit Glucuronsäure am C<sub>3</sub>-Zucker und einer Aldehydgruppe am C<sub>4</sub> des Agykons (Guo & Kenne, 2000; Marciani et al., 2000). Insbesondere die Quillajasaponine (siehe Tab. 2-1) sind hinsichtlich ihrer Aktivität als Immunadjuvantien gut untersucht (Kamstrup et al., 2000). Ihre Vertreter wie das QS 21 bzw. das semisynthetisch dargestellte hydrolyse stabile Derivat GPI-0100 werden heute in Impfstoffen verwendet oder befinden sich in der klinischen Prüfung (So et al., 1997; Barr et al., 1998, Zhang et al., 2003).

Kensil et al. führten im Jahr 1991 Modifizierungen der C<sub>4</sub>-Aldehydfunktion mit Periodat durch, die ebenfalls zum Wirkungsverlust führten; auf die entscheidende Bedeutung der Aldehydfunktion am C<sub>4</sub> des Aglykons und die Rolle der glykosidisch am C<sub>3</sub> vorhandenen Glucuronsäure wurde man bei der Impfstoffentwicklung aufmerksam (Soltysik et al., 1995). ISCOMs (immune stimulatory complexes) sind Adjuvantien, die die Immunantwort verstärken und eine MHC-Klasse 1-abhängige T-Zellreaktion ermöglichen indem sie Peptide bzw. Proteine ins Zytoplasma einer antigenpräsentierenden Zelle transportieren (Morein, 1988). Von dort können sie in das endoplasmatische Retikulum gelangen, wo sie an neue MHC-Klasse-1-Moleküle gebunden und dann als Peptid-MHC-Klasse-1-Komplex an die Zelloberfläche transportiert werden (Sjolander et al., 1998). Die ISCOMs sind Mizellen und bestehen im Wesentlichen aus einer Matrix der als Detergens wirkenden Quillajasäure mit Phospholipiden und Cholesterol sowie sich darin befindenden antigen wirksamen Proteinen. Aufgrund der angenommenen Verschmelzung dieser Mizellen mit der antigenpräsentierenden Zelle gelangt das Antigen in das Zytoplasma und löst dort Reaktionen aus, die das infizierende Virus selbst in der Zelle verursachen würde (Barr et al., 1998). Aufgrund eingehender Untersuchungen möglicher ISCOM-Trägermoleküle mit dem Ziel einer verbesserten Immunisierung beim Menschen wurde rein empirisch die Quillajasäure als optimaler Bestandteil der ISCOM-Matrix bewertet und ist bis heute ihr Hauptbestandteil. Die chemische Modifizierung der Aldehydfunktion und der Glucuronsäure der Quillajasäure haben Soltysik

et al. untersucht und herausgefunden, dass jegliche Veränderung der Aldehydgruppe zu einer Verminderung der Wirksamkeit als Adjuvans führte (Soltysik et al., 1995).

Die in Abb. 3-11 dargestellten Saponine, die in Kombination mit Agrostin untersucht wurden, zeigen eine Korrelation zwischen dem untersuchten zytotoxizitätsinduzierenden und dem in der Literatur beschriebenen immunstimulierenden Potential für Saponine mit Gypsogenin/Quillajasäure als Aglykon (Higuchi et al., 1987; Marciani et al., 2000). Marciani et al. untersuchten insbesondere ein Quillajasäurederivat, das QS-21, nach Deacylierung des Terpenesters an der Fucose des C<sub>28</sub>-Zuckers (DS-1), da QS-21 nahe bzw. unter der CMC (kritische mizellenbildende Konzentration) von 40-60 µg/ml zur Hydrolyse neigt. Sie beobachteten zuerst eine verminderte Zytotoxizität und stellten ebenfalls fest, dass eine Aldehydgruppe die notwendige Voraussetzung für immunstimulatorische Wirksamkeit ist, da die DS-Saponine, ähnlich wie Polysaccharid-Immunmodulatoren, ihre Oligosaccharid-vermittelte Affinität zu Antigen-präsentierenden Zellen bewahrten (Bohn et al., 1995). DS-1 zeigte eine veränderte IgG-Antwort (gute IgG 1, schlechtere IgG2a/b-Antwort). Die Deacylierung führte von einer Th1- zu einer Th2 Immunstimulierung, möglicherweise aufgrund einer veränderten sterischen Lage der Aldehydgruppe oder aufgrund einer schwächeren Affinität zur Lipid-Doppelschicht (Marciani et al., 2001). Erwähnenswert sind hier die Parallelen zwischen der Fc-Rezeptor-vermittelten Phagozytose eines (opsonierten) Antigens als entscheidender Prozess einer Immunreaktion und der rezeptorvermittelten Endozytose als Voraussetzung einer Toxinaufnahme.

Neben der Aldehydgruppe an Pos. 4 und der Glucuronsäure an Pos. 3 des Aglykons spielt offensichtlich auch die Größe, die Azidität und der Grad der Verzweigung der Zuckerketten an C<sub>3</sub> und C<sub>28</sub> eine entscheidende Rolle, da Oligosaccharidketten eine Affinität zu entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Macrophagen besitzen (Bomford et al., 1992). Diesbezüglich ist die Beobachtung wichtig, dass die *in vitro*-Aktivität des glykosylierten Saporin-3 im Vergleich zum nicht-glykosylierten Saporin-6 wesentlich aktiver war, was für eine entscheidende Bedeutung einer Kohlehydrat-Interaktion des Intoxikationsmechanismus spricht. In Analogie zu den Arbeiten von Bomford et al. stehen Beobachtungen zu zwei Hauptsaponinen aus *Gypsophila paniculata* L. (siehe Abschnitt 2.18: 2 Banden auf der DC detektiert, eine DC-Bande mit authentischer Referenz als Gypsosid identifiziert), die eine ähnliche Adjuvans-Aktivität bzw. in unseren Untersuchungen ähnliche Enhancereigenschaften für Agrostin wie das Saponinum album zeigten. Diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den Zytotoxizitätsuntersuchungen strukturell definierter bisdesmosidischer Triterpensaponine, Quillajasaponin und Saponinum album (Abb. 3-11)

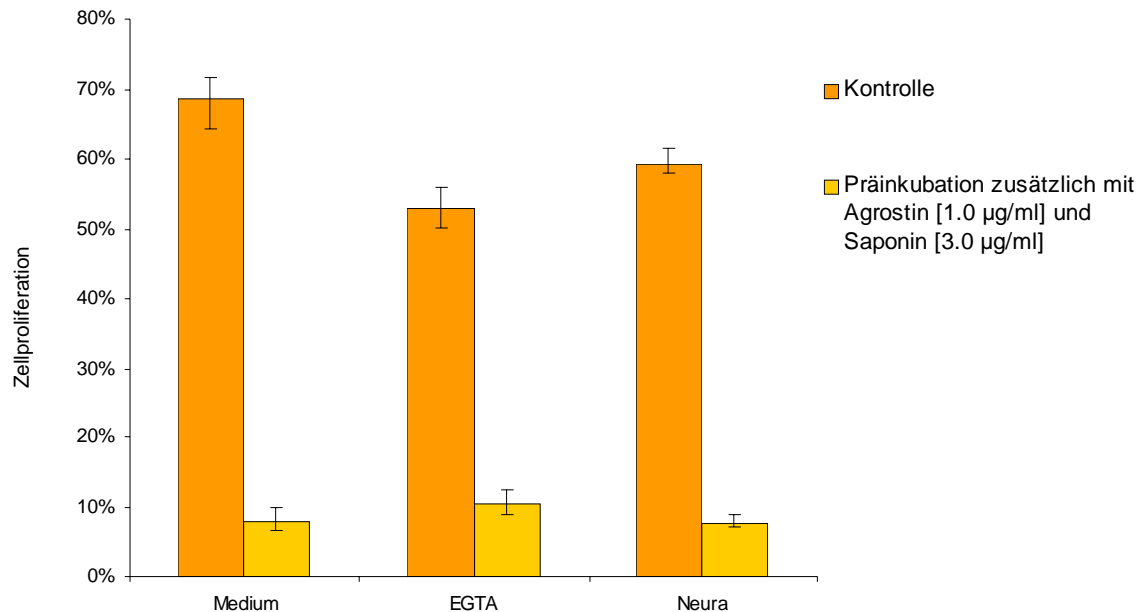
schließen eine mögliche Funktion anderer aktiver Substanzen im Gypsophilasaponin aus. Für die Interaktion des Saponins mit dem Cholesterol der Plasmamembran einer Zielzelle und der anschließenden Aggregation der Kohlehydratketten wird eine Neuordnung der Phospholipiddoppelschicht und die Bildung von Poren und die Notwendigkeit einer Anzahl von mindestens 3 Monosacchariden am C<sub>3</sub> des Aglykons diskutiert (Armah et al., 1999). Diese Saponine besitzen eine wesentlich geringere hämolytische Aktivität; Saponine mit Monosacchariden am C<sub>3</sub> des Aglykons sind am stärksten hämolytisch aktiv (Francis et al., 2002). Demzufolge scheint der in dieser Arbeit beschriebene Effekt des Saponins auf einem anderen Mechanismus zu beruhen. Die Saponine AsB (Gypsogenin-Derivat) und AsE (Quillajasäurederivat) unterscheiden sich jeweils nur in der Position 16 des Aglykons, sind jedoch- vermutlich aufgrund des Monosaccharids an Pos. C<sub>3</sub> des Aglykons- bei 3 µg/ml inaktiv und zeigen auch bei 6 µg/ml keine signifikante Toxizität in Kombination mit Agrostin. Das Monodesmosid GoB besitzt am C<sub>3</sub> ein glykosidisch gebundenes Trisaccharid und zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität als die Bidesmoside (Abb. 3-11), während die Abspaltung beider Zuckerketten zum kompletten Wirkungsverlust des gebildeten Hydrolyseproduktes Gypsogenin führt (siehe Abschnitt 3.8.1).

In niedrigen Konzentrationen beschädigen die untersuchten Saponine die Membran einer Zelllinie nicht, sondern führen zu einer in vitro-Proliferationssteigerung (Abb. 3-5 u. 3-8) sowie zu einer reversiblen Permeabilisierung der Zellmembran (Melzig et al., 2001) und zur Vesikelbildung innerhalb des Zytoplasmas, was zu einer unspezifischen Tendenz einer Zelllinie führen kann, Makromoleküle und Toxine wie das Agrostin leichter aufzunehmen (Sung et al., 1995). Die spezifische chemische Struktur der Saponine scheint der entscheidende Faktor für eine kooperative Zytotoxizität zu sein: im Gegensatz zu den toxizitäts-induzierenden Saponinen steht das Helianthosid, ein aus einer Asteraceae gewonnenes neutrales bidesmosidisches Triterpensaponin mit Echinocystsäure als Aglykon (Hiegemann et al., 1995). Es besitzt eine weitaus geringere Aktivität (siehe Tab. 3-3 und 3-5). Dem Helianthosid fehlt die C<sub>4</sub>-Aldehydgruppe und das saure Trisaccharid an Position C<sub>3</sub> des Aglykons. Trotz einer ansonsten hohen strukturellen Ähnlichkeit zu den aktiven Saponinen in Kombination mit dem Agrostin zeigt es eine wesentlich geringere Toxizität: IC<sub>50</sub>[Kombination mit Helianthussaponin]: 0.3 µg/ml, IC<sub>50</sub>[Kombination mit Agrostemma-Saponin]: 5.7 ng/ml (Abb. 3-7 u. Tab. 3-3). Eine weitere spezifische und synergistische Wechselwirkung wird dem Isochinolinalkaloid Tetrandrin, einem natürlichen Calciumantagonisten, in Kombination mit Quillajasaponin (QS) zugeschrieben, eine Wirkungsverstärkung, die mit einer Porenbildung aufgrund einer Cholesterol-Saponin Komplex-

bildung in der Zellmembran erklärt wird (Leung et al., 1997). Möglicherweise ist die fehlende Funktion der B-Kette (Haptomer) der RIPs vom Typ I, eine Anhaftung an der Zielzelloberfläche zu ermöglichen, in unserem Modell durch das Saponin vermittelt worden. Allerdings ist eine kovalente Bindung zwischen Saponin und Protein (z.B. über eine Aldiminbindung zwischen einer Protein-Aminogruppe als Schiff-Base und Saponin-Aldehydfunktion) wie bei den Lectinen zwischen A- und B-Kette (über eine Disulfidbrücke) auszuschließen, denn zum einen zeigten die gefällten saponinfreien Proteinfractionen äußerst schwache Toxizitätswerte im Bereich einer  $IC_{50}$  von über 20  $\mu\text{g/ml}$ , zum anderen war es uns nicht möglich, eine Schiff-Basenreaktion bzw. eine kovalente Bindung z. B. zum Aldimin zwischen Agrostin und Saponin durchzuführen (siehe Abschnitt 3.9). Derartige Wechselwirkungen im Zusammenhang mit T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen sind in der Immunologie bekannt (Rhodes, 1989; Rhodes et al., 1995). Eine hypothetische stabile intramolekulare Verbindung des Saponins mit Agrostin, die sowohl die toxischen, als auch die antigenpräsentierenden Eigenschaften modifiziere, erscheint auch deshalb unwahrscheinlich, weil unter Bedingungen, die eine Schiff-Basenreaktion begünstigt hätten, nach Dialyse der Lösung weder eine Zytotoxizität gemessen, noch per DC Saponine identifiziert werden konnten. Allerdings war die Zytotoxizität wiederherstellbar, sobald das Lyophilisat mit Saponin kombiniert wurde (siehe Abschnitt 3.10, Abb. 3-16).

### 3.9 Versuche zur Hemmung der Toxizität von Saponin und Agrostin

#### 3.9.1 Einfluss von Neuraminidase und EGTA auf den toxischen Effekt



A

**bb. 3-12:** Versuch der Inhibition des toxischen Effektes durch Vorinkubation mit EGTA [1.0 mM], bzw. Neuraminidase [50 mU] und nach 1 h Inkubation von Saponin und Agrostin für weitere 2 h. Es konnte keine signifikante Toxizitätshemmung festgestellt werden.

Methode:	MTT-Assay
Ausgangszellzahl:	10 <sup>3</sup> Zellen/Well
Inkubationszeit:	72 h (Vorinkubation: 3 h)
Zelllinie:	ECV 304
c [Agrostin]	1.0 µg/ ml
c [Saponin]	3.0 µg/ml
c [EGTA]	1.0 mM
c [Neuraminidase]	50 mU

(U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n=3; p < 0.05)

##### 3.9.1.1 Präinkubation von Neuraminidase (EC 3.2.1.18)

Neuraminidase ist ein aus dem Bakterium *Clostridium perfringens* (*C. welchii*) isoliertes Enzym, das terminale N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) von diversen Glykoproteinen auf Oberflächenrezeptoren von Eukaryontenzellen hydrolytisch abzuspalten vermag (Cassidy et al., 1965). Die Gruppe der Sialinsäure bindenden Siglecs ist ein Beispiel Neuraminidase-sensitiver Toxine. Auch das *Influenza*-Virus bindet über viruseigene Lectine, die Hämagglutinine, an terminale Sialinsäureeinheiten von Membranglykoproteinen und



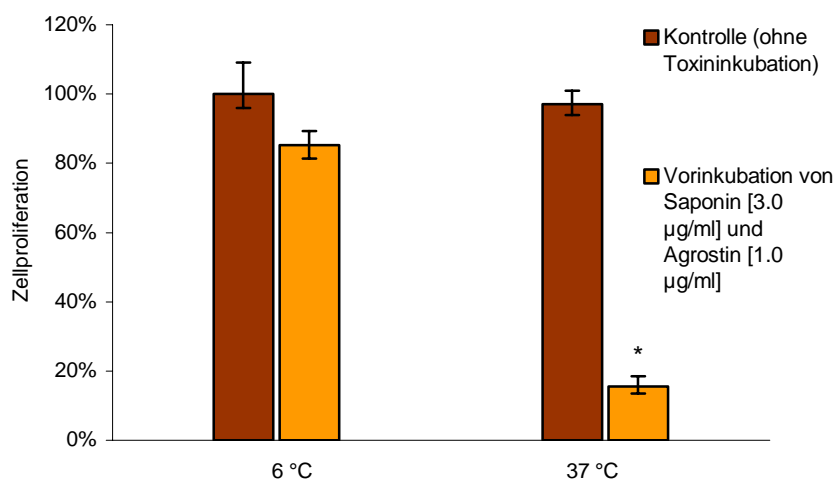
ermöglicht so die Invasion in die Wirtszellen. Dabei spaltet 1 U Neuraminidase 1.0  $\mu\text{mol}$  N-Acetylneuraminsäure je Minute bei pH 5.0 und 37 °C ab (Cassidy et al., 1965). Das Enzym hat ein pH-Optimum von 5.0; bei pH <5.0 und pH > 8.0 ist es inaktiv. Generell wird dieses Enzym aufgrund dieser Eigenschaften als Rezeptor-zerstörendes Enzym bezeichnet. Für diese Untersuchungen war entscheidend, ob die Neuraminidase bestimmte Glycoproteine der Oberflächenrezeptoren der Zielzelle anzugreifen vermag, die verantwortlich für die Aufnahme des RIP I sind. Wie in Abb. 3-12 zu sehen ist, bleibt die Toxizität mit und ohne Vorinkubation von Neuraminidase unverändert; offensichtlich läuft der Toxinadhäsionsschritt unterschiedlich zu dem der üblichen, kohlehydratassoziierten Lectine ab (siehe Abschnitt 3.9.3).

#### 3.9.1.2 Präinkubation von EGTA (Ethylenglykoltetraacetat)

Viele physiologische Prozesse einer Eukaryontenzelle sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, z.B. diejenigen, welche von drei verwandten Zelloberflächen-Glykoproteinen, die man zusammen als Cadherine (Cadherin E/ N/ P) bezeichnet, abhängig sind. Bei Fehlen von  $\text{Ca}^{2+}$  machen die Cadherine eine Konformationsänderung durch und werden rasch von proteolytischen Enzymen abgebaut. Zwischen den Zellen befinden sich interzelluläre Verbindungen wie tight junctions, adherens junctions, Desmosomen und Gap junctions, die das apikale Kompartement vom basalen trennen. Diese intrazellulären Verbindungen unterliegen in ihrem Aufbau und Erhalt einer Calciumabhängigkeit (Teng & Wilkinson, 2000). Neben einem veränderten Verhalten der Tight Junctions (TJs) und E-Cadherin, einem Protein der Adherens Junctions (AJs), ändert sich während kurzfristigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug auch die endozytotische Aktivität. Zu diesem Zweck verwendeten wir die "Calcium Chelation" Methode, bei welcher  $\text{Ca}^{2+}$  durch den Chelatkomplexbildner EGTA komplexiert wird, was eine schnelle, reversible Hemmung der Endo-und insbesondere der Exozytoserate hervorruft (Teng & Wilkinson, 2003). Die Klasse der C-Typ-Lectine sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Die C-Typ Lectine liegen entweder membrangebunden oder sezerniert vor. C-Typ Lectine sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und haben eine oder mehrere CRDs (Carbohydrate Recognition Domains). Man hat nach heutigem Stand um die 50 endogene C-Typ-Lectine identifiziert. Alle besitzen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindungsdomäne und ein hydrophobes Zentrum. Im vorliegenden Versuch zeigte sich unabhängig von der physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Endozytose eine kaum veränderte Zytotoxizität nach extrazellulärer Calciumkomplexierung durch Vorinkubation mit EGTA (siehe Abb. 3-12). Calcium-assoziierte Effekte scheinen beim toxischen Effekt der Kombination von Saponin und Agrostin keine Rolle zu spielen.

### 3.9.2 Temperaturabhängigkeit des getriggerten toxischen Effektes

Bei Vorinkubation von Saponin (3 µg/ml) und Agrostin (1 µg/ml) und Mediumwechsel nach 2 h war nach 72 h bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 37°C eine deutliche Abnahme der Zellproliferation zu beobachten (Abb. 3-13), die bei Verringerung der Temperatur auf 6°C beinahe aufgehoben war. Die starke Verringerung der Zytotoxizität auf eine beinahe unveränderte Zellproliferationsrate deutet darauf hin, dass der Agrostin-Aufnahmemechanismus in einer temperaturabhängigen, rezeptorvermittelten Endozytose besteht, die wesentlich schneller abläuft als z.B. eine Phagozytose oder Pinozytose (Fittipaldi, 2003). Dieser Mechanismus wird auch als verzögerte Endozytose beschrieben, da die internalisierten, Klathrin-umhüllten Vesikel vorübergehend in einem „fixierten“ Stadium, nahe der Plasmamembran, verweilen und bei Temperaturerhöhung auf RT wieder in den Zellzyklus eingebunden werden. Desweiteren bestätigen diese Untersuchungen die These, dass die Temperaturabhängigkeit dieses endozytotischen Mechanismus reversibel ist (Teng & Wilkinson, 2000).



**Abb. 3-13:** Inhibition des getriggerten toxischen Effektes. Es wurde eine zweistündige Vorinkubation von Saponin und Agrostin bei 37°C, sowie bei 6°C durchgeführt, 2 h vorinkubiert, mit Medium substituiert und nach 72 h die Zytotoxizität ermittelt.

Methode:	MTT-Assay
Ausgangszellzahl:	10 <sup>3</sup> Zellen/Well
Inkubationszeit:	72 h (Vorinkubation: 2 h)
Zelllinie:	ECV 304
c [Agrostin]	1.0 µg/ ml
c [Saponin]	3.0 µg/ml

(U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n=3; p < 0.05; \* signifikante Toxizitätserhöhung im Vergleich zur Vorinkubation bei 6 °C)

### 3.9.3 Untersuchung der Wirkung von unterschiedlichen Zuckern auf die Zytotoxizität von Agrostin und Saponin

Lectine besitzen eine individuelle Affinität zu verschiedenen Zuckern auf der Oberfläche (Glykokalix) der Zellmembran. Bei gleichzeitiger Inkubation von entsprechenden zur Wechselwirkung mit dem Lectin befähigten Monosacchariden lässt sich der erste Schritt, die Anheftung der B-Kette des Lectinmoleküls an die Zielzelle, verhindern und dadurch die Toxizität aufheben.

Nach Stirpe unterscheidet man zwischen Typ 1- und Typ 2-RIP, wobei Agrostin zum Typ 1-RIP gezählt werden muss, da es keine die Zellanhaftung vermittelnde B-Kette, wie z.B. die Lectine der Samen von *Ricinus communis* L. oder *Abrus precatorius* L., besitzt (Stirpe et al., 1983).

Die B-Kette bindet an bestimmte Monosaccharide, Amino Zucker oder Oligosaccharide eines Makromoleküls und vermittelt so die Anhaftung des Lectins an lebende Zellen und ermöglicht die endozytotische Aufnahme eines durch Disulfidbrücken gebundenen Toxomers (A-Kette). Durch reduktive Spaltung dieser Disulfidbrücke im Zytoplasma wird die toxische A-Kette freigesetzt. Der Wirkungsmechanismus der A-Kette eines Lectins entspricht der eines Typ 1-RIP: RIPs sind enzymatisch wirkende Proteine, zumeist Glykoproteine, die eine hochspezifische N-Glykosidase-Aktivität besitzen, durch die ein Adenin-Molekül aus der rRNA abgespalten und dadurch der gesamte Translationsapparat inaktiviert wird.

Entscheidende Voraussetzung für die Toxizität eines RIP sind zum einen die Bindung an die Zelloberfläche, zum anderen die dadurch ausgelöste Endozytose. Die Translokation durch die Membran eines intrazellulären Kompartiments, die für den Eintritt in das Zytoplasma erforderlich ist, ist der am wenigsten erforschte Transportschritt im gesamten Zellintoxikationsprozess, allerdings muss man davon ausgehen, dass eine Anhaftung eines Toxins an die Zelloberfläche den entscheidenden Impuls für eine Endozytose und damit für eine toxische Wirkung auslöst. Eine diesbezüglich untersuchte Inaktivierung des Agrostins durch die spezifisch lectinbindenden Monosaccharide D-Glucose, D-Mannose, D-Galaktose, L-Fucose, N-Acetyl-D-Galaktosamin, N-Acetyl-D-glucosamin und Sialinsäure in einer Konzentration von 1.0 mg/ml war nicht möglich. Auch eine Neuraminidase-Vorinkubation, die mögliche Kohlehydratwechselwirkungen unterbinden könnte, erbrachte keine Hemmung des toxischen Effektes. Eine rezeptorvermittelte Endozytose läuft innerhalb ca. einer Stunde ab; die durch die ECIS-Ergebnisse dargestellte Kinetik der Toxinaufnahme (siehe Abschnitt 3.13) und ihre

Temperaturabhängigkeit (siehe Abschnitt 3.9.2) deuten dementsprechend auf eine rezeptorvermittelte Endozytose hin (Fittipaldi, 2003).

**Tab. 3-4:** Einfluss der Monosaccharide auf die Zytotoxizität von Agrostin und Saponin

Präinkubiertes Monosaccharid	Eingesetzte Konzentration	Wachstumshemmung [%]
D-Glucose	1.0 mg/ ml	95.3 ± 3.5 [n.s.]
D- Glucuronsäure	1.0 mg/ ml	94.9 ± 5.2 [n.s.]
D-Mannose	1.0 mg/ ml	95.7 ± 2.8 [n.s.]
D-Galaktose	1.0 mg/ ml	95.1 ± 5.7 [n.s.]
L-Fucose	1.0 mg/ ml	95.3 ± 4.9 [n.s.]
N-Acetyl-D-Galaktosamin	1.0 mg/ ml	97.2 ± 3.1 [n.s.].
N-Acetyl-D-glucosamin	1.0 mg/ ml	95.3 ± 4.8 [n.s.]
Sialinsäure	1.0 mg/ ml	96.6 ± 3.8 [n.s.]

Methode: MTT-Assay  
 Ausgangszellzahl:  $10^3$  Zellen/Well  
 Inkubationszeit: 72 h (Vorinkubation: 2 h)  
 Zelllinie: ECV 304  
 c [Zucker] 1.0 mg/ ml  
 c [Agrostin] 30 ng/ ml  
 c [Saponin] 3.0 µg/ml

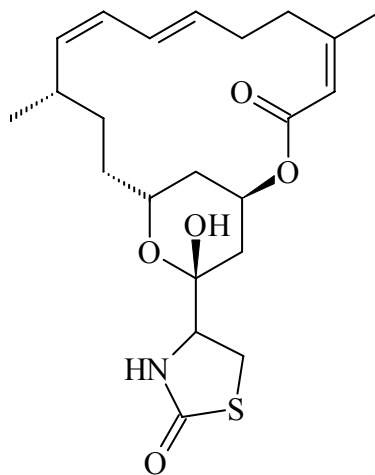
(U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n=3; p < 0.05; n.s.: nicht signifikant im Vergleich mit der Zytotoxizität von Agrostin und Saponin ohne Präinkubation eines Zuckers)

Es wurden acht Monosaccharide (D-Glucose, D- Glucuronsäure, D-Mannose, D-Galaktose, L-Fucose, N-Acetyl-D-Galaktosamin, N-Acetyl-D-glucosamin und Sialinsäure) in einer Konzentration von 1.0 mg/ ml getestet, welche aufgrund ihrer chemischen Struktur und der Konfiguration zur spezifischen Wechselwirkung mit den meisten Lectinen befähigt sind (Olsnes, 1987). Keiner dieser zur Bindung und Inaktivierung einer Vielzahl von Lectinen befähigten Zucker konnte im MTT-Assay an ECV 304-Zellen die saponinvermittelte Toxizität des Agrostins unterbinden. Auch eine Präinkubation von Glucuronsäure, die eine entscheidende Rolle bezügl. der Struktur-Wirkungs-Beziehungen des Saponins spielt, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zytotoxizität.

### 3.9.4 Untersuchung des Effektes von Latrunculin A auf die Toxizität von Agrostin und Saponin

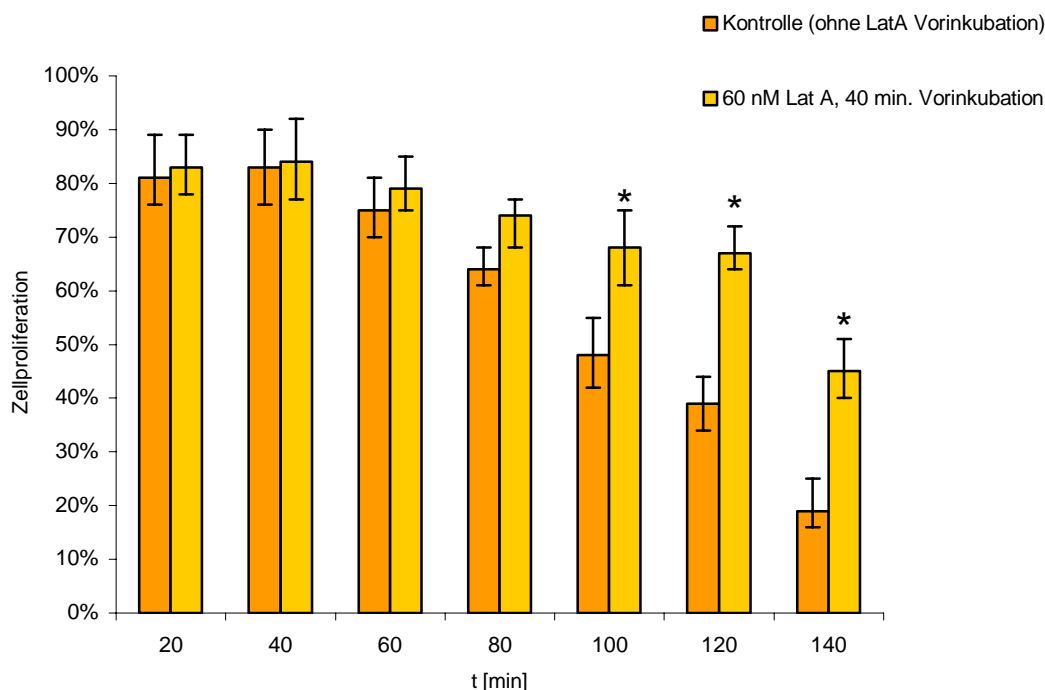
Ein potenter Inhibitor der Phagozytoseaktivität von ruhenden und aktivierten Makrophagen ist Latrunculin A.

**Latrunculin A**, ein Actin-bindendes Toxin ( $M_r$ : 421.6 D) des Seeschwammes *Latruncula magnifica* aus dem Roten Meer, hemmt die Actin-Polymerisierung in vitro (Morton et al., 2000) und in vivo (De Oliveira, 1988; Spector et al., 1983).



**Abb. 3-14:** Struktur des Actin-bindenden Toxins Latrunculin A aus *Latruncula magnifica* (De Oliveira, 1996).

Das Latrunculin A wurde in einer Konzentration eingesetzt, in der die Phagozytose gehemmt wird und keine direkte Toxizität auf die Zellkultur ausgeübt wird (De Oliveira et al., 1988). Erst nach einer Inkubationszeit von 100 min findet eine signifikante Hemmung im Vergleich zur Kontrolle statt (Abb. 3-15). Allerdings wird auch nach einer Inkubationszeit von 140 min keine vollständige Aufhebung der getriggerten Toxizität erreicht, was für einen alternativen endozytotischen Effekt spricht, der nicht vollständig durch eine Präinkubation mit Latrunculin A gehemmt wird (Morton et al., 2000).



**Abb. 3-15:** Hemmung der getriggerten Toxizität durch 40 min. vorinkubiertes Latrunculin A (60 nM): Inkubation von 3 µg/ml Saponin und 1 µg/ ml Agrostin über einen Zeitraum von 20/ 40/ 60/ 80/ 100/ 120 und 140 min, anschließend Mediumwechsel und Toxizitätstest nach 72 h.

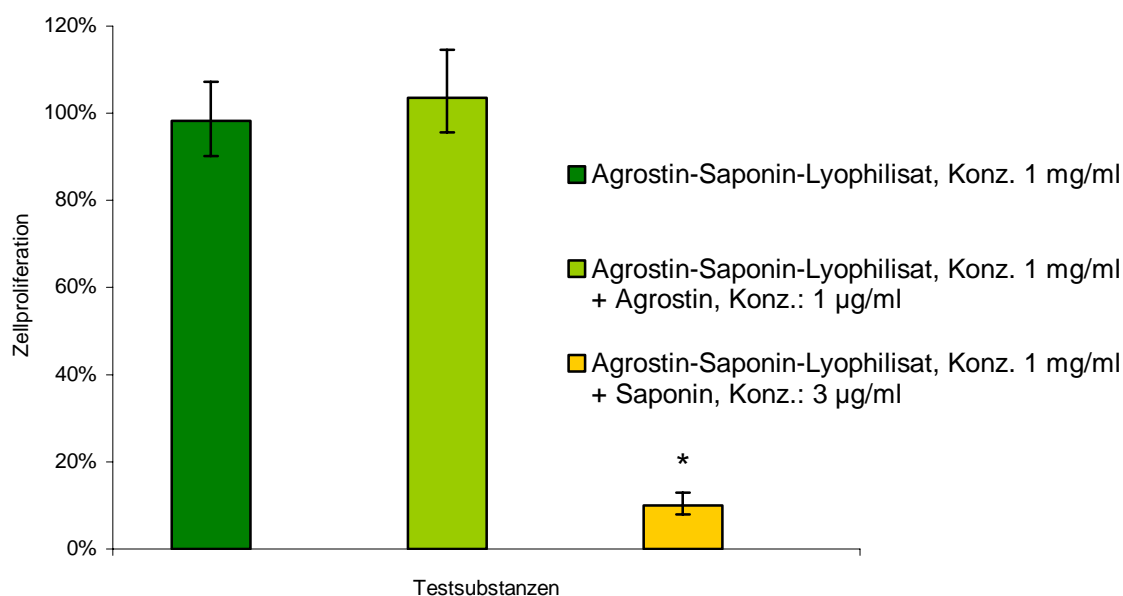
Methode: MTT-Assay  
 Ausgangszellzahl:  $10^3$  Zellen/Well  
 Inkubationszeit: 72 h  
 Zelllinie: ECV 304

(U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ;  $p < 0.05$ ; \*signifikante Hemmung der Zytotoxizität im Vergleich zur Kontrolle)

### 3.10 Untersuchung zur direkten chemischen Wechselwirkung von Saponin und Agrostin/ HSA

Die Untersuchung zur direkten chemischen Wechselwirkung des Saponins und des Agrostins wurde in 5 mM Sörensen-Phosphatpuffer (Konz. Saponinum album: 1 mg/ml; Konz. Agrostin: 100 µg/ml, Konz. Humanserumalbumin: 1 mg/ ml;  $V_{\text{Ges.}}$ : 10 ml; Reaktionszeit: 24 h; 37°C; pH 8.6) durchgeführt, unter Bedingungen, die eine Schiff-Basenbildung begünstigen und eine Bildung einer kovalenten Bindung zwischen der C<sub>4</sub>-Aldehydgruppierung des Triterpens mit freien Aminogruppen des Agrostins ermöglichen würden (Soltysik et al., 1995; Rhodes et al., 1989). Eine Dialyse mit mehrfachem Mediumwechsel (Dialysiermembran:

MWCO.: 25000) diente der Entfernung überschüssigen Saponins. Nach 24 h Dialyse unter Eiskühlung wurde lyophilisiert und 1 mg des Lyophilisates zur Toxizitätsmessung verwendet. Nach 180 min Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel und nach weiteren 3 Tagen ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Weder im Humanserumalbumin noch im Agrostin konnten in der DC nach erschöpfender Dialyse Saponinreste im Lyophilisat nachgewiesen werden: Die qualitative dünnschichtchromatographische Überprüfung des Lyophilisats auf Saponine war negativ. Die Zytotoxizitätsuntersuchungen bestätigten dieses Resultat (siehe Abb. 3-16).



**Abb. 3-16:** Präinkubation des Agrostin-Saponin-Lyophilisats mit Mediumwechsel nach 180 min und Zytotoxizitätsmessung nach 72 h.

Methode:	MTT-Assay
Ausgangszellzahl:	10 <sup>3</sup> Zellen/Well
Inkubationszeit:	72 h (180 min Präinkubation und Mediumwechsel)
Zelllinie:	ECV 304

(U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3; p < 0.05; \* signifikante stärkere Zytotoxizität im Vergleich zum Lyophilisat/ der Kombination aus Lyophilisat und Agrostin)

Sowohl das Lyophilisat selbst, als auch dessen Kombination mit 1 µg/ml Agrostin zeigt keine Toxizität, hingegen ist die Toxizität mit Saponinkombination vergleichbar mit den bereits bekannten Toxizitätsmessungen zwischen Saponin und Agrostin (siehe Tab. 3-5).

Offensichtlich entsteht unter Bedingungen, die eine Schiff-Basenbildung begünstigen, keine kovalente Bindung zwischen Agrostin und Saponin, die Substanzen scheinen auf einem alternativen, bisher unbekannten Weg zu interagieren.

### 3.11 Untersuchungen unterschiedlicher Toxine in Kombination mit Gypsophilasaponin

Die zu untersuchenden Toxine sollten sich sowohl durch ihre strukturelle Verwandtschaft zum Agrostin auszeichnen, als auch unfähig sein, die Zellmembran von Eukaryonten selbständig zu durchdringen. Darüber hinaus sollten die Toxine einen Wirkungsmechanismus aufweisen, der in möglichst ähnlicher Weise wie Ribosomen-inaktivierende Proteine die Proteinsynthese unabhängig vom Zelltyp noch in äußerst geringer Konzentration inhibiert.

Besonders geeignet erschienen folgende Gruppen:

1. **N-Glykosidasen** (systematische Bez.: rRNA N-Glykohydrolase; EC 3.2.2.22), die spezifisch die Abspaltung des Adenin-4324 (u.a. verantwortlich für die EF-I/II-Bindung an das Ribosom; siehe Abschnitt 1) der 28S-rRNA von Ratten abspalten (Endo & Tsurugi, 1987; Barbieri et al., 1997). Dadurch blockieren diese Toxine den Elongationsschritt der Proteintranslation. RIPs (ribosomeninaktivierende Proteine) werden in zwei bzw. neuerdings in drei Klassen unterteilt: Typ I (Mr: 26-31 kDa) (Roncuzzi & Gasperi-Campani, 1996), Typ II (zwei disulfidverbundene Polypeptidketten, eine entspricht einem Typ I RIP, die andere einem Lectin) und Typ III (nicht-toxische Typ II-RIPs wie Ebulin und Nigrin b; Barbieri et al., 1993). In beiden Fällen ist das aktive Zentrum des Toxins eine purinreiche Region, die sog.  $\alpha$ -Sarcin-Schleife (Endo et al., 1988). In einer aktuellen Publikation wird berichtet, dass die Toxizität der Typ 2 RIPs unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität auf Nukleinsäuren und Ribosomen ist (Barbieri et al., 2004). Man nimmt an, dass ein Molekül Toxin im Zytosol ausreicht, um eine Zelle zu töten. Allerdings ist die biologische Bedeutung der RIPs im Organismus noch unbekannt, vermutlich besteht ihre Aufgabe in der Abwehr von Virus- oder Pilzinfektionen (Park et al., 2002).
- **Agrostin**, ein glykosyliertes Typ 1-RIP aus den Samen von *Agrostemma githago* L. (siehe Einleitung; Stirpe et al, 1983; Hebestreit & Melzig, 2003). Die chemische Struktur des Agrostins ist bis heute noch nicht aufgeklärt worden.
  - **Saporin** (SO 6, siehe Abb. 3-17), ein unglykosyliertes Typ 1-RIP aus den Samen von *Saponaria officinalis* L., sowie rekombinant hergestelltes His-Saporin (Sap-3) binden



spezifisch an  $\alpha$ -Macroglobulin- und Megalinrezeptoren (Ippoliti, 1992; Cavallaro et al., 1995). Saporin-6 wird heute als DNA/ RNA/ Poly(A) N-Glycosidase (RNA-N-Glycosidase, DNA-Adenosin-Glycosidase) klassifiziert (Barbieri, 1997). Saporin gehört zusammen mit Luffin zu RIPs vom Typ I mit HIV-1 Integrase-Inhibitor-Aktivität (Au, 2000). Saporin bindet an den  $\alpha_2$ -Makroglobulin Rezeptor (Ippoliti et al., 2000), der auch als „low-density lipoprotein receptor-related protein“ (LRP) bekannt ist, allerdings nicht, wie früher angenommen, nur an diesen Rezeptor, was aktuelle Untersuchungen an rekombinant hergestelltem Saporin-5 und 6 belegen (Bagga et al., 2003).



**Abb. 3-17:** Diagramm der 3-D Struktur des Saporins (SO6). Durch die Buchstaben A-H werden die acht  $\alpha$ -Helices dargestellt. Diese Struktur ist typisch für alle RIPs, die in der C-terminalen Region ihr aktives Zentrum und vermutlich ebenfalls die Erkennungsmerkmale für das Substrat besitzen (Savino et al., 2000).

- **Ricin** (RTA: A-Kette des Ricins, siehe Abb. 1-1) aus den Samen von *Ricinus communis* L.

Ricin (RIP II;  $M_r$ : 64 kDa) besteht aus zwei Polypeptidketten, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die B-Kette (262 Aminosäuren,  $M_r$  34 kDa, Haptomer), ein Lectin (lat.: legere = auswählen) oder Phytohämagglutinin, heftet sich auf Grund ihres Zucker bindenden Potentials an Galaktose- beziehungsweise Mannosereste der Zelloberfläche (Katzin B J, 1991, Montford W, 1987). Dies führt zur Endozytose des gesamten Toxin-Rezeptor-Komplexes. Die A-Kette (267 Aminosäuren,  $M_r$  32kDa, Effektomer), eine hoch spezifische N-Glucosidase, wirkt als Ribosomen-inaktivierendes Protein (RIP): Sie spaltet von der 28S ribosomalen RNA einen Adeninrest ab. Diese Abspaltung verhindert die Bindung eines Elongations-

faktors (siehe Abschnitt 1), die Proteinsynthese wird angehalten und die Zelle stirbt. Toxine dieser Art verfügen in der Regel über einen eigenständigen zellulären Aufnahmemechanismus, deshalb sind sie sowohl in zellfreien Aktivitätsassays als auch gegenüber kultivierten Zellen sehr potent. Wahrscheinlich genügt ein einziges Molekül, um eine Zelle abzutöten. Das früher als einheitliche Verbindung betrachtete Ricin ist nach neueren Untersuchungen aus einem Komplex aufgebaut, der aus zwei Lectinen (RCL I und II) und zwei Toxinen (RCL III [Ricin D] und IV) besteht (siehe Abb 1-1; Olsnes, 1987).

- **Nigrin b** aus der Rinde von *Sambucus nigra* L. ( $M_r$ : 58.0 kDa)

Dieses im Gegensatz zum Ricin weniger toxische RIP II (=RIP III) besteht ebenfalls aus zwei Ketten, einer durch Disulfidbrücken verbundenen A-Kette ( $M_r$ : 26.0 kD und einer B-Kette ( $M_r$ : 32.0 kDa). Nigrin b hat keinerlei Einfluss auf die pflanzliche oder bakterielle Proteinsynthese, besitzt jedoch stark hemmende Wirkung auf die Proteinsynthese von Säugetierzellen in vitro (Citores et al., 1996; Vandenbussche, 2004). Dieses Toxin ist eine rRNA N-Glycosidase der rRNA intakter Säugerzellen (Battelli et al., 1996; Girbes et al., 1996).

2. **ADP-ribosylierende Enzyme**, die den eukaryontischen Elongationsfaktor EF II am Diphthamid-715 (modifiziertes Histidin) verändern (siehe Abschnit 1).

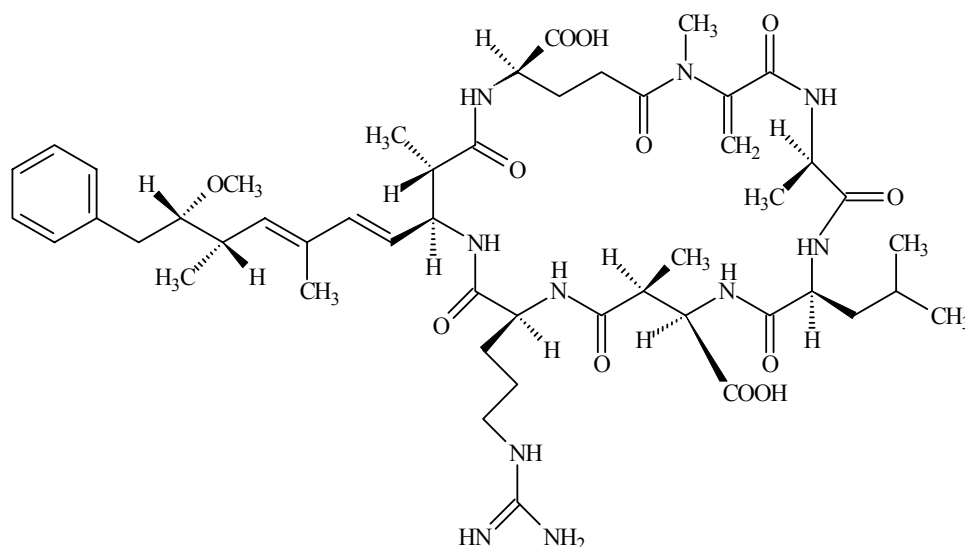
- **Diphtheriatoxin (DT)** aus *Corynebacterium diphtheriae* (siehe Abb. 1-1):

Diphtheriatoxin wird von *Corynebacterium diphtheriae* als Protein von 535 Aminosäuren Länge ausgeschieden. Codiert wird es von einem Phagen (wenn die Bakterien nicht lysogeniert sind, entsteht bei Infektion keine Diphtherie, sondern eine „normale“ Halsentzündung). Das Protein gehört zu den A-B-Toxinen, bei denen das aktive Fragment nach der Bindung an die Zielzelle proteolytisch abgespalten wird (Ariansen et al., 1993; Drazin et al., 1971). Im nativen Protein können drei verschiedene Domänen unterschieden werden (Collier & Kandel, 1971; Yamaizumi, 1978).

### 3. Peptidtoxine:

- **Microcystin LR** (siehe Abb. 3-18), ein kommerziell erhältliches Heptapeptid ( $M_r$ : 995.2 D) und Protein-Phosphatase 1 und 2 A-Inhibitor aus dem Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa*, einem Einzeller, der in Süßwasser oder in der Ostsee lebt und neben Blaualgen einen wesentlichen Faktor der sog. Wasserblüte darstellt. Mit Ausnahme von Hepatozyten ist dieses Peptid nicht zellmembranpermeabel und hat keinen Effekt auf Proteinkinasen (Chong et al., 2000). Microcystine inhibieren Enzyme der Zellregulation (Proteinphosphatasen) und fördern das Tumorwachstum.

Sie verursachen bei oraler Aufnahme in leichteren Fällen Übelkeit und Durchfall, sonst akuten und chronischen Leberschaden, vermutlich auch Leberkrebs. Heute sind über 60 verschiedene Microcystine bekannt.



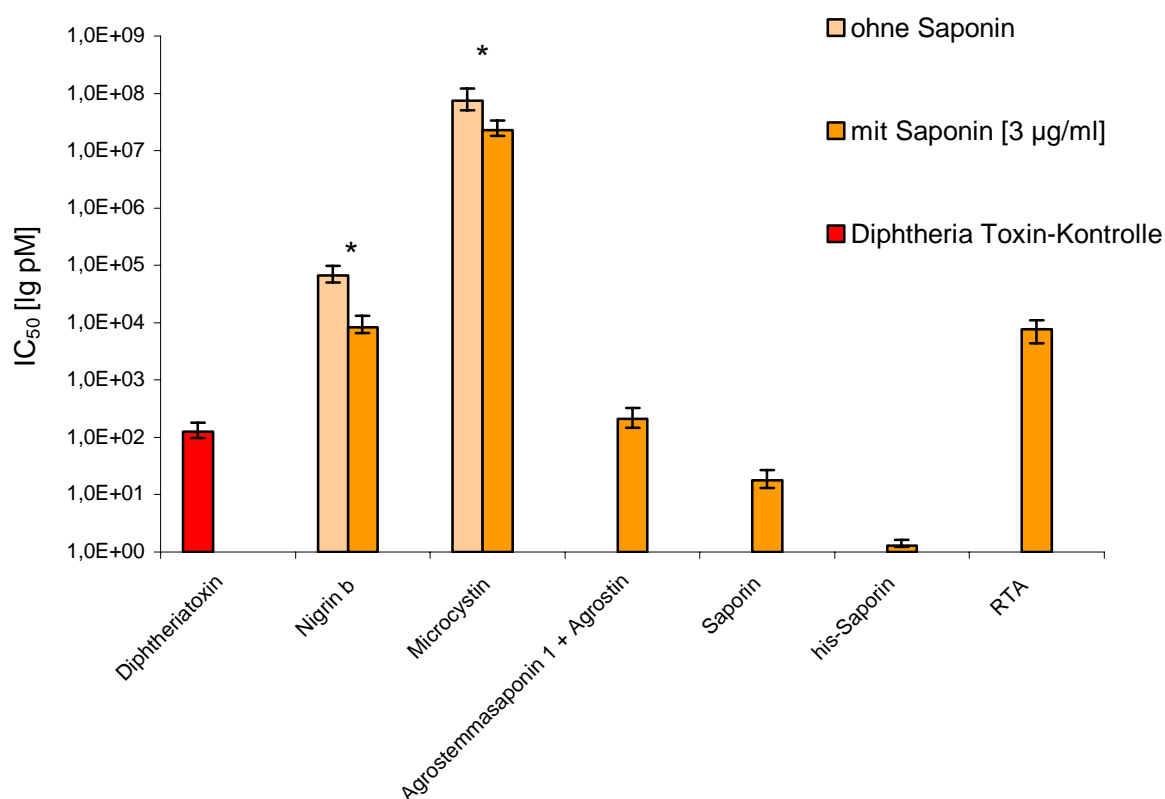
**Abb. 3-18:** Struktur des Heptapeptides Microcystin LR aus *Microcystis aeruginosa*.

- Ein ebenfalls kommerziell erhältliches Peptid, ein Apoptoseinduktor (zur Apoptose: siehe Abschnitt 1.4) wurde getestet:

- **FAS-C-terminales Tripeptid:** Ac-Ser-Leu-Val-OH ( $M_r$ : 359.42 Da)

Dieses Tripeptid mit der C-terminalen Sequenz des humanen Fas (CD 95/ APO-1, apoptosevermittelnder Oberflächenrezeptor) hemmt die Interaktion des humanen Fas mit der Fas-assoziierten Phosphatase-1 (FAP-1). Direkte Microinjektion dieses Tripeptides in das Zytoplasma führt zur Induzierung Fas-assoziiierter Apoptose einer Kolon-Zelllinie, die Fas und FAP-1 exprimiert (Scheller et al., 2002; Yanagisawa et al., 1997).

### 3.11.1 Zytotoxizität von Proteintoxinen in Kombination mit Saponin



**Abb. 3-19:** Zytotoxizität (IC<sub>50</sub>-Werte) der Protein-/ Peptidtoxine Diphtheriatoxin, Nigrin b, Microcystin, Agrostin, (his-) Saporin und Ricin-Toxin A (RTA) in Kombination mit Saponin (3.0 µg/ml Saponinum album, bzw. Agrostemmasaponin).

Methode: MTT-Assay  
 Ausgangszellzahl: 10<sup>3</sup> Zellen/Well  
 Inkubationszeit: 72 h  
 Zelllinie: ECV 304  
 c [Saponinum album] const.: 3.0 µg/ ml

(Student t-test; Mittelwert ± SD; n=3; p < 0.05)

(\* signifikant erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu Nigrin b/ Microcystin ohne Saponininkubation)

Unter den gleichen Bedingungen wurde auch das Fas-Tripeptid (siehe Abschnitt 3.11) in Kombination mit Gypsophilasaponin *in vitro*-toxikologisch untersucht. Es wurden Konzentrationen von 50/ 100/ 500 nmol und 1/ 10/ 50 µmol und in einer zweiten Versuchsreihe von bis zu 100 µmol eingesetzt. Weder das Tripeptid allein noch in Kombination mit Gypsophilasaponin (3.0 µg/ml) konnte eine signifikante Zytotoxizität unter den unten angegebenen Bedingungen auslösen (IC<sub>50</sub> [Fas-Tripeptid und Gypsophilasaponin] > 100 µM, n = 3).

Für Agrostin, (his-) Saporin und RTA konnte ohne gleichzeitige Saponininkubation aufgrund zu geringer Eigentoxizität keine  $IC_{50}$  ermittelt werden. Diphtheriatoxin diente als Positivkontrolle ( $IC_{50}$ :  $1.27 \cdot 10^2$  pM). Diejenigen Saponine und Proteintoxine, die der gleichen Pflanzenfamilie (Caryophyllaceae) und chemischen Struktur (Triterpensaponine und RIPs) angehören, zeigen dies am deutlichsten: saure bisdesmosidische Triterpensaponine mit einer Formylgruppierung am C<sub>4</sub> des Aglykons, einem verzweigten Zuckerrest am C<sub>3</sub> und C<sub>28</sub> des Aglykons scheinen optimale Voraussetzungen für eine kooperative Toxizität in diesem Modell zu bieten. Im Falle des Agrostins und des strukturell verwandten (his-) Saporins ist diese Analogie zwischen botanischer Abstammung und der Wirksamkeit der jeweils kombinierten Inhaltsstoffe offenkundig.

Es wurden bereits Untersuchungen hinsichtlich der Enhancereigenschaften des DS-1 (=Quillajasäureanalogon des getesteten ArjC) mit Aminoglykosid-Antibiotika (Recchia, 1995) und Cisplatin (Gaidi et al., 2002) durchgeführt; Insulin wurde bezüglich einer okularen, bzw. einer nasalen Applikationsmöglichkeit untersucht, was zur Entwicklung von Insulin-Nasensprays geführt hat, die sich in klinischer Prüfung befinden (Chao et al., 1998; Pillion, 2000). Auch HIV-Impfstoffe wurden auf eine QS-21-Adjuvanswirkung bei einer intramuskulären- und intranasalen Applikation untersucht (Sasaki et al., 1998).

Mit der hier dargestellten Enhancereigenschaft der beschriebenen Saponine (siehe Tab. 2-1 und Abb. 3-11) in Kombination mit Agrostin, einem Toxin, das von F. Stirpe et al. im Jahre 1983 beschrieben wurde, wird ein toxikologischer Ansatz genutzt, der bereits in vitro erstaunliche Ergebnisse hinsichtlich einer tumortherapeutischen Anwendung in Kombination mit auf RIP I-basierenden Immunotoxinen bietet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zytotoxizität des Agrostins an ECV 304-Zellen getestet. Eine äußerst schwache Zytotoxizität (max. eingesetzte Konz.:  $1.85 \cdot 10^6$  pM) konnte bestätigt werden (Tab. 3-5). Dieses Ergebnis korreliert mit toxikologischen Untersuchungen verschiedener RIPs, die Kofaktoren wie ATP zur Aktivierung benötigen (Carnicelli et al., 1997). Alle weiteren isolierten Proteine aus der Kornrade, sowie das ebenfalls aus einer Caryophyllaceae isolierte, nicht glykosylierte Saporin aus *Saponaria officinalis* L. (max. eingesetzte Konz.:  $9.3 \cdot 10^{-7}$  mM) und das rekombinant hergestellte, glykosylierte his Sap-3 (max. eingesetzte Konzentration:  $9.3 \cdot 10^{-7}$  mM), die DTA-Kette aus Diphtheriatoxin (max. eingesetzte Konzentration:  $6.05 \cdot 10^{-6}$  mM), sowie die RTA-Kette aus dem Ricin (max. eingesetzte Konzentration:  $3.45 \cdot 10^{-5}$  mM) zeigten kaum Toxizität in vitro (Tab. 3-5). Erst die Kombination mit Saponinen definierter Struktur (siehe Abb. 3-11) wie es z. B. beim Agrostemmasaponin oder dem Gypsosid aus Gypsophila-Arten der Fall ist, führen zu einer eindrucksvollen Zytotoxizität. Durch diese Kombination ist es

möglich, die Konzentrationen der Einzelkomponenten so weit abzusenken, dass diese für sich allein im Zellkulturmodell keine Zytotoxizität aufweisen, während die Kombination hochtoxisch ist. Dies beweist auch die synergistische Wirkung einer von der Arbeitsgruppe Fuchs (UKBF, Berlin) durchgeführten Kombination aus Gypsophilasaponin (3 µg/ml) mit a) Saporin, b) Saporin-3 (Sap-3) und c) einem Sap-3 gekoppelten Immunoadaptiertoxin mit dem epidermal growth factor (EGF) als Ligand (Abb. 3-19 und Tab. 3-5). Die kombinatorische Wirksamkeit wurde sowohl an ECV-Zellen als auch an NIH-3T3/ HER 14- und MCF-7-Zellen getestet. Erstmals wurde ein stärkerer zytotoxischer Effekt der Kombination von Saporin mit Gypsophilasaponin im Vergleich zu reinem Diphtheriatoxin beobachtet (Heisler et al., 2004). Wie bei den Proteinen besteht offenbar auch bezüglich der Saponine eine Analogie zwischen der systematischen bzw. der chemotaxonomischen Einordnung und ihrer Wirksamkeit bzw. der synergistischen Toxizität einer Kombination beider Substanzen (Agrostin aus *Agrostemmae semen* und Saporin aus *Saponariae semen*, beides Caryophyllaceae). Bei Toxinen anderer Herkunft zeigten RTA (Ricin A-Kette, *Ricini semen*) und das nicht-toxische Typ II RIP Nigrin b (*Sambucus nigrae cortex*, *Adoxaceae*) eine schwächere Aktivität. Das Peptidtoxin Microcystin aus der Blaualge *Microcystis aeruginosa*, Diphtheriatoxin A aus *Corynebacterium diphtheriae* und das rekombinant hergestellte FAS-Tripeptid sind Toxine mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus und zeigen kaum noch zytotoxische Aktivität in Kombination mit Saponinen.

**Tab. 3-5:** Zusammenstellung der wichtigsten IC<sub>50</sub>-Werte

A: Rohextrakte B: Reinsubstanzen/ Kombinationen	IC <sub>50</sub>
<b>A: Rohextrakte</b>	
50 % wässrig-methanolischer Extrakt aus den Samen von <i>Agrostemma githago</i> L.	6.5 ± 1.1 µg/ml
wässriger Extrakt aus den Samen von <i>Agrostemma githago</i>	0.3 ± 0.1 µg/ml
<b>B: Reinsubstanzen/ Kombinationen</b>	
Positivkontrolle (Diphtheriatoxin)	1.27 * 10 <sup>-4</sup> µM
Agrostin	n.i. (max. Konz.: 1.85 * 10 <sup>-3</sup> mM)
Agrostemmasaponin 1 (1)	6.4 ± 1.5 µM
Agrostemmasaponin 2 (2)	6.2 ± 1.5 µM
Agrostin und Agrostemmasaponin 1 <sup>a</sup>	5.7 ± 1.7 ng/ml
Agrostin und Helianthussaponin 2 <sup>a</sup>	300 ± 90 ng/ml
Nigrin b	6.6 * 10 <sup>-2</sup> µM
Nigrin b und Gypsophilasaponin <sup>a</sup>	8.2 * 10 <sup>-3</sup> µM
Saporin	n.i. (max. Konz.: 9.3 * 10 <sup>-4</sup> µM)
Saporin und Gypsophilasaponin <sup>a</sup>	1.8 * 10 <sup>-5</sup> µM
his-Saporin	n.i. (max. Konz.: 9.3 * 10 <sup>-4</sup> µM)
his-Saporin und Gypsophilasaponin <sup>a</sup>	1.3 * 10 <sup>-6</sup> µM
RTA	n.i. (max. Konz.: 3.45 * 10 <sup>-2</sup> µM)
RTA und Gypsophilasaponin <sup>a</sup>	7.63 * 10 <sup>-3</sup> µM
DTA	n.i. (max. Konz.: 6.05 * 10 <sup>-3</sup> mM)
DTA und Gypsophilasaponin <sup>a</sup>	n.i. (max. Konz.: 6.05 * 10 <sup>-6</sup> mM)
Microcystin	7.4 * 10 <sup>-2</sup> mM
Microcystin und Gypsophilasaponin <sup>a</sup>	2.3 * 10 <sup>-2</sup> mM

<sup>a</sup> Saponinkonzentration 3.0 µg/ml (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD; n=3; p < 0.05; n.i.: no inhibition)

Methode: MTT-Assay  
Ausgangszellzahl: 10<sup>3</sup> Zellen/Well  
Inkubationszeit: 72 h  
Zelllinie: ECV 304

## 3.12 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine effektive Methode der Lichtmikroskopie zur Beobachtung von Proteinen innerhalb der Zelle. Es ist dabei z. B. möglich, die subzelluläre Lokalisierung eines Proteins zu bestimmen, die Änderung der Lokalisierung als Antwort der Zelle auf bestimmte Stimuli hin zu untersuchen oder die relative Lokalisierung mehrerer Proteine zueinander zu vergleichen. Unter Verwendung geeigneter Techniken ist es nicht nur möglich, Proteine in fixierten sondern auch in lebenden Zellen nachzuweisen.

Zur Lokalisierung des Agrostins im Cytosol der ECV-304-Zellen ist eine Vorbehandlung bzw. Fixierung des Materials notwendig, die sowohl die Zellstrukturen als auch die antigenen Eigenschaften des Proteins bestmöglich erhalten soll. Im vorgestellten Fall erwies sich die Fixierung mit Formaldehyd als optimal.

Will man Fixationsartefakte ausschließen, müssen Zellen in lebendem Zustand beobachtet werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit durch eine säulenchromatographische Kopplung des Agrostins mit dem Lebendfarbstoff Alexa Fluor 488 realisiert.

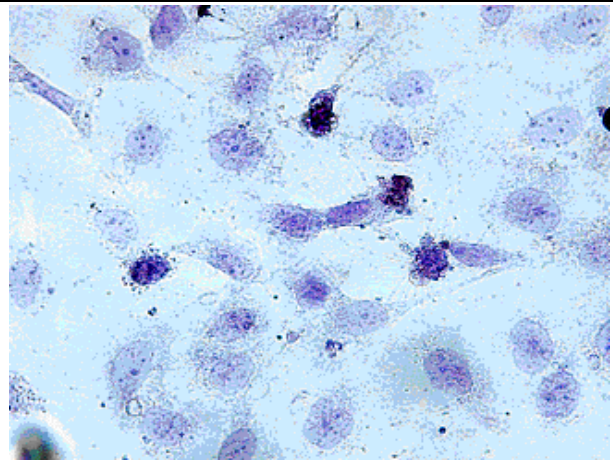
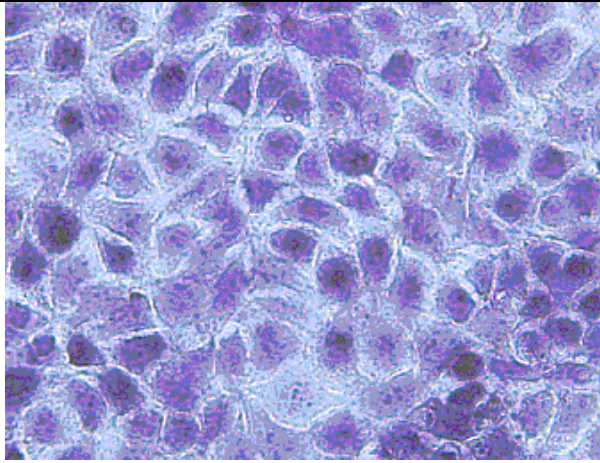
### 3.12.1 Immunfluoreszenzfärbung

Die Visualisierung des FITC-markierten Anti-Kaninchen-Globulins gegen das antikörpergekoppelte Agrostin im Zytosol der Zellen erfolgte durch die Immunfluoreszenzmikroskopie. In vivo-Untersuchungen erfolgten durch direkte Kopplung des Agrostins mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 488 (zur Durchführung siehe Abschnitt 2.14.1 und 2.16). Die Hämatoxylinfärbung diente der Visualisierung der Zellkerne im Zellverband (siehe Abb. 2.13.7 und Abb. 3-20 a & b).

Abb. 3-20 stellt die morphologische Veränderung eines ECV 304-Monolayers nach 72-stündiger Inkubationszeit der Toxine dar (vergleiche Abb. 3-2). Markiertes Agrostin konnte im perinukleären Bereich des Zytosols, vermutlich an den Ribosomen des rauen ER, lokalisiert werden (Abb. 3-21 c-d). Die Kinetik der Toxinaufnahme, die bereits durch die gertriggerte Zytotoxizität (siehe Abb. 3.10) und später durch die ECIS-Untersuchungen (siehe Abb. 3-25) belegt werden konnte, liegt hier unterhalb 2 h (Abb. 3-21 a - b).

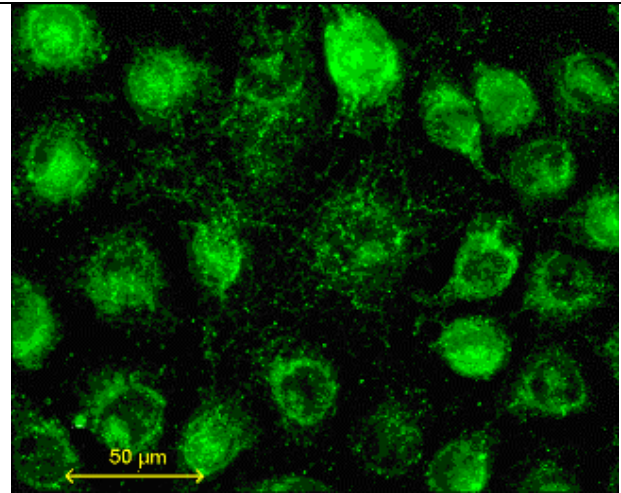
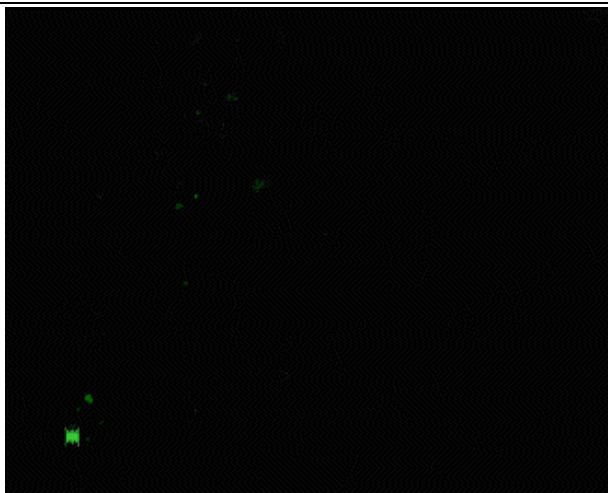


Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen von ECV 304-Monolayern mit und ohne Toxininkubation (3  $\mu\text{g/ml}$  Saponin und 1  $\mu\text{g/ml}$  Agrostin)



a) Monolayer einer intakten ECV 304-Zelllinie (Proliferationszeit: 72 h, Hämatoxylinfärbung)

b) ECV 304-Zellen nach Inkubation (72h) von Agrostin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und Sap. album (3  $\mu\text{g/ml}$ )



c) ECV 304 Monolayer Negativkontrolle

d) 72 h Inkubation mit FITC-markiertem Agrostin

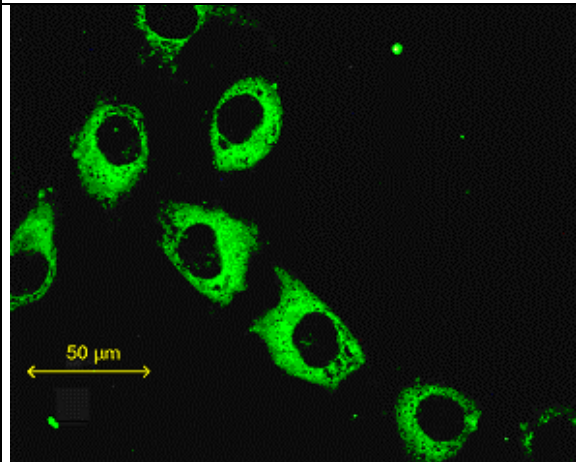
Hämatoxylinfärbung, FITC-Markierung: siehe Abschnitt 2.13.7 und 2.14.1

**Abb. 3-20:**

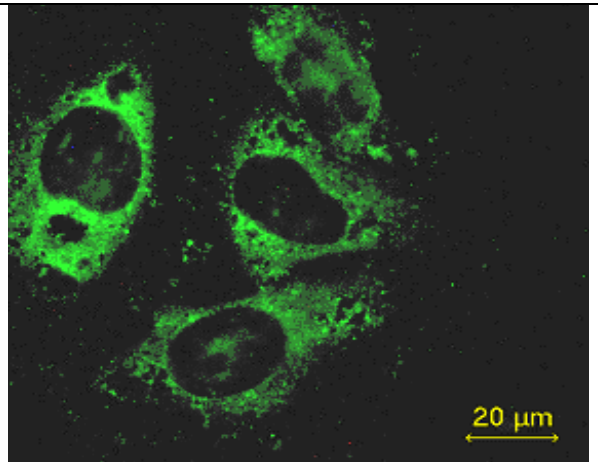
a), b) Hämatoxylinfärbung von ECV 304-Zellen  
c), d) Visualisierung des Agrostins durch FITC-Anti-Antikörpermarkierung

Entscheidend für die Einleitung des am besten untersuchten Endozytosewegs, der rezeptor-vermittelten Endozytose, ist das Klathrin, ein dimeres Protein, das sich zu einem käfigähnlichen Gebilde, einem „coated pit“ zusammenlagert (siehe Abb. 1-4 u. 1-5). Nach der Endozytose zerfallen diese und das Klathrin sammelt sich wieder an der Plasmamembran.

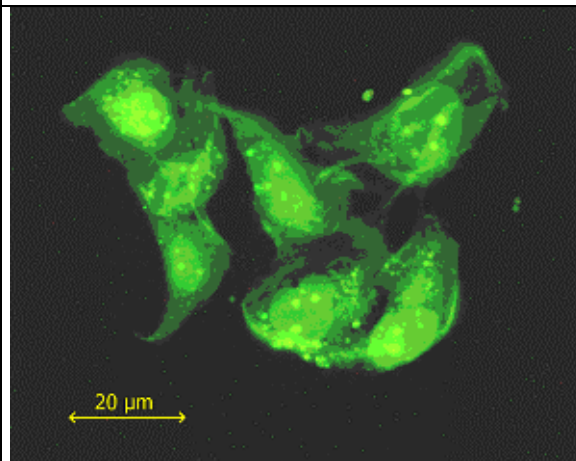
Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen mit AlexaFluor 488-markiertem Agrostin/  
mit FITC immunhistochemisch markiertem Agrostin



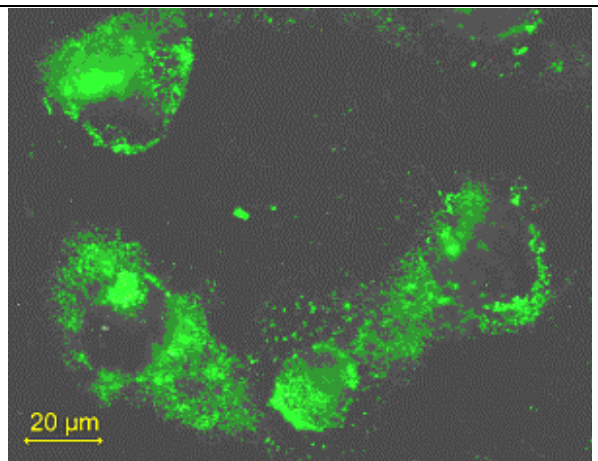
a) ECV 304 Zellen: Perinukleäre Anordnung des Agrostins nach 2h Inkubationszeit.



b) Vergrößerter Ausschnitt von ECV 304 Zellen nach 2h Inkubationszeit.



c) ECV 304 Zellen: AlexaFluor-markiertes Agrostin nach 24 h Inkubationszeit in zytosolischen Vesikeln.



d) vergrößerter Ausschnitt von ECV 304 Zellen: AlexaFluor-markiertes Agrostin nach 24 h Inkubationszeit.

FITC und AlexaFluor-Markierung: siehe Abschnitt 2.14 und 2.16

**Abb. 3-21:**

a), b) Visualisierung des Agrostins durch FITC-Antikörpermarkierung

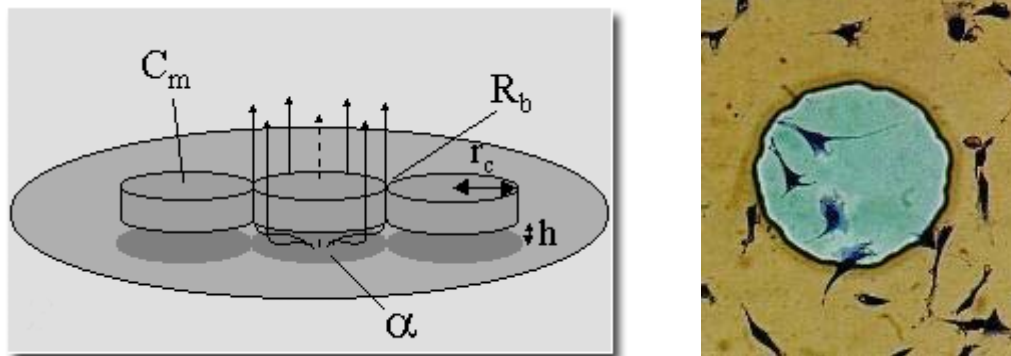
c), d) Visualisierung des Agrostins durch AlexaFluor-Kopplung

Aktuelle Veröffentlichungen belegen, dass neben der Klathrin vermittelten Endozytose alternative Aufnahmemechanismen existieren, was in vitro am Beispiel von Klathrin-unabhängig und Latrunculin A-unempfindlich aufgenommenem Transferrin dargestellt wird

(Moskowitz et al., 2003). Ein weiteres Beispiel liefert eine vergleichende Untersuchung bezüglich der Trichosanthin (TCS)-Toxizität gegenüber zwei Zelllinien: einer TCS-empfindlichen Chorionkarzinomzelllinie (JAR) und einer TCS-unempfindlichen Hepatomzelllinie (H35). Durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie konnte nach kurzer Zeit FITC-markiertes TCS in Coated pits der JAR-Zelllinie nachgewiesen werden, während von der H35-Zelllinie nur geringe Mengen TCS langsam und unspezifisch aufgenommen wurden (Chan et al., 2003). Auch für ein Dimer zwischen Pro-Urokinase und Saporin wird ein neuer, alternativer Aufnahmemechanismus diskutiert. Der Mechanismus zur Zelladhäsion wird hier mit der Anheftung an den Urokinase-Rezeptor und nachfolgender LRP (low density lipoprotein-related receptor protein) -Bindung, die zur Auslösung einer Endozytose dient. Dies ist ebenfalls ein zweistufiger Prozess, der insofern vergleichbar ist, als das Saponin vermutlich entsprechend die Zelladhäsion vermittelt und erst dadurch die Membranpassage des Toxins ermöglicht (Ippoliti et al., 2000). Der gesamte Endozytoseprozess stellt sich in der gegenwärtigen Diskussion als wesentlich komplexer und differenzierter dar als bisher angenommen (Kirchhausen, 2000; Pelkmans, 2002), was die Untersuchungen der unvollständigen Zytotoxizitätshemmung mit Latrunculin A, sowie die nicht erfolgte Hemmung durch Neuraminidase und EGTA-Präinkubation belegen (siehe Abschn. 3.8.4). Viel spricht derzeit dafür, dass Zelleintritt und Transport der Toxine innerhalb der Zellen nicht toxinspezifisch sind, sondern dass sie den Weg zelleigener Moleküle nutzen (Barbieri et al., 1993). Es wird angenommen, dass die RIPs von den Proteintransportern des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ins Zytosol transferiert werden, nachdem sie durch das trans-Golgi-Netzwerk in retrograder Richtung transportiert wurden (siehe Abschnitt 1.2 u. 1.3). Alternativ könnte auch eine Membrandestabilisierung, die infolge einer direkten Lipid-Protein-Wechselwirkung eintritt, einen Translokationsmechanismus darstellen (Schwarze & Dowdy, 2000). Ein Vergleich der Wechselwirkungen verschiedener RIPs mit der Lipiddoppelschicht lässt auch Rückschlüsse auf mögliche Mechanismen zu, derer sich die Lectine bedienen, um die auf dem Weg ins Zytosol befindliche intrazelluläre Membranbarriere zu überwinden.

### 3.13 ECIS-Untersuchungen

Diese erstmals von Ivar Giaever und Charles R. Keese im Jahre 1993 beschriebene Methode erlaubt es, kontinuierlich und nicht invasiv sowohl die Migration als auch morphologische Veränderungen eines konfluenten Monolayers darzustellen. Man verwendet eine kleine (250  $\mu\text{m}$ ), sehr dünne, transparente Goldelektrode (Arbeits- oder Messelektrode) sowie eine dreihundertfach größere Bezugselektrode. Dadurch wird die Messelektrode zum Nadelöhr für den Stromfluss und die gemessene Impedanz ist fast ausschließlich abhängig von der Zellschicht auf der Messelektrode. In einem 8-well-array wird der Mittelwert aus 10 Messungen pro well bestimmt, da im verwendeten Gerät zehn über den Boden des Zellkulturgefäßes verteilte Messelektroden gleichmäßig angeordnet sind. Die Elektroden werden so in den Boden des Kulturgefäßes eingearbeitet, dass auf ihnen die Zellen angezüchtet werden können. Dadurch entsteht auf der Elektrodenoberfläche ein konfluenter Monolayer, der sich wie ein Isolator verhält. Dementsprechend kann man bei Anlegen eines Wechselstromes einen plötzlichen Anstieg des Wechselstromwiderstandes (Impedanz) beobachten, sobald die Zellen auf der Oberfläche der Elektroden spreiten und konfluent werden, da die ausgebildete Plasmamembran den Stromfluss vermindert. Die nun auftretenden Schwankungen der Impedanz sind ein Zeichen der vertikalen Bewegungen (micromotions) der Zellen. Die micromotions sind ein Maß für die Morphologie und die Lebensfähigkeit der Zellen (Wegener et al., 1996). In Abhängigkeit der Frequenz des angelegten elektrischen Feldes kann ein Teil des Stromes durch die Zellen, also die Basalmembran, das Zytoplasma und die apikale Plasmamembran (transzellulär) oder um die Zellkörper herum durch den Interzellularspalt und die tight junctions (parazellulär) fließen. Die Menge des transzellulär fließenden Stromes ist abhängig von der Kapazität der Plasmamembran, während der parazellulär fließende Strom abhängig vom Abstand zwischen Zelle und Substrat, sowie vom Widerstand des interzellulären Spaltes ist. Die angelegten elektrischen Felder sind sehr schwach und damit nicht invasiv. Somit kann die Methode bei jedem beliebigen Zellproliferationsstadium angewendet werden, ohne dass das Wachstum oder die Differenzierung der Zellen in irgendeiner Weise behindert werden (siehe Abb. 3-24 und 3-25).



**Abb. 3-22:** Abb. links: Modell von drei Zellen auf einer Goldelektrode mit den daraus resultierenden drei Parametern  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  die sich durch das Verhalten der Zellen als Isolatoren ableiten lassen (s.u.). Abb. rechts: einige fixierte und angefärbte NIH 3T3-Zellen.

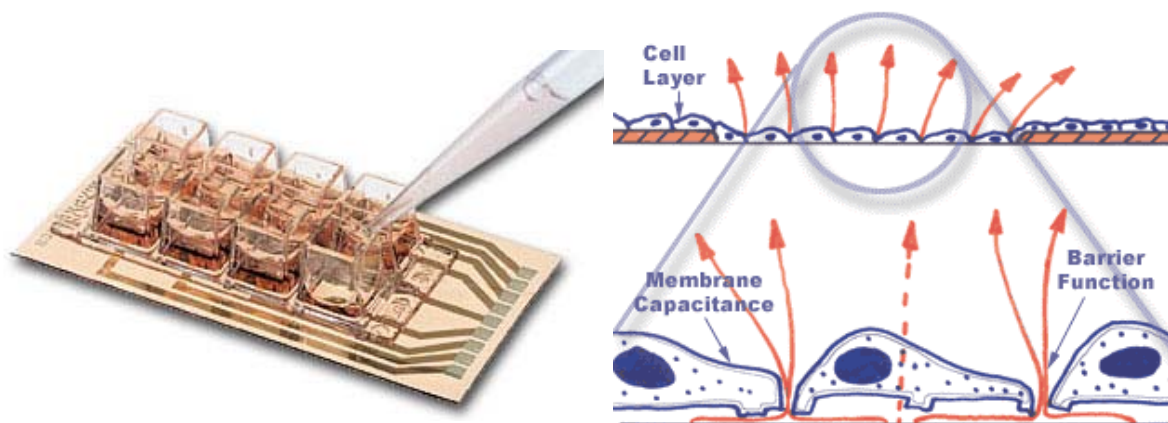
(Abb. aus <http://www.biophysics.com>)

Drei Parameter können von diesem Modell abgeleitet werden:

$R_b$ : Widerstand zwischen angrenzenden Zellen (=barrier resistance); er stellt ein Maß für den Widerstand des Monolayers dar.

$\alpha$ : Parameter, der die Impedanz der Zell-Substrat-Berührungszone, sowie die Schwankung des Zell-Substrat-Kontaktes widerspiegelt.

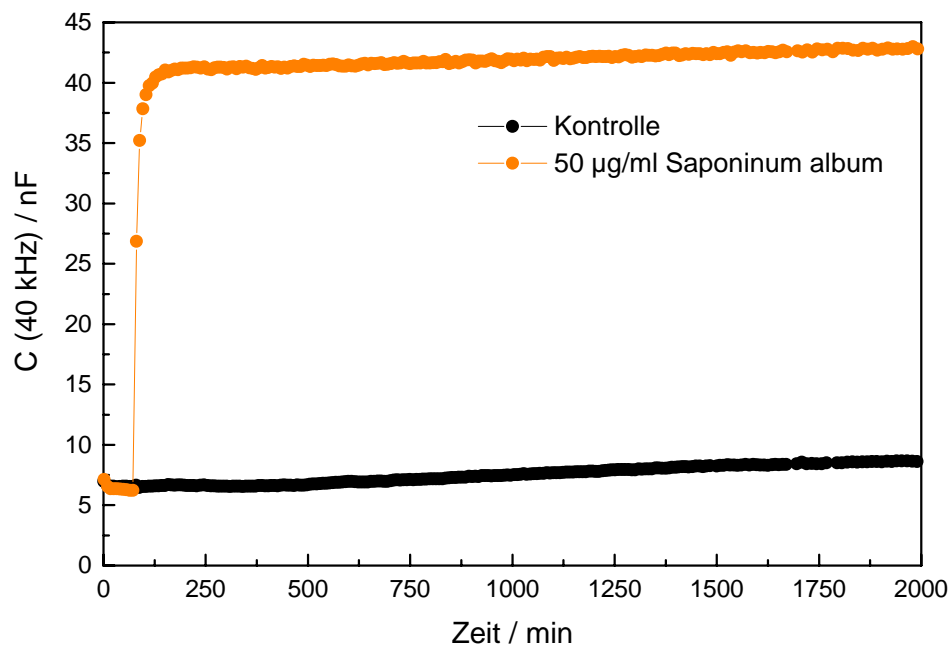
$C_m$ : quantitatives Maß für die Morphologie der Plasmamembran (membrane capacitance).



**Abb. 3-23:** Die Zellen werden in einem 8-well-Kulturgefäß auf einem Elektrodenarray in jedem Well ausgesät (links). Abb. rechts: Stromfluss durch einen Zellmonolayer auf einer Goldelektrode (Durchmesser: 250  $\mu\text{m}$ ) im Mikromaßstab.

(Abb. aus <http://www.biophysics.com>)





**Abb. 3-24:** ECIS-Untersuchungen nach Inkubation einer zytotoxischen Saponinkonzentration von 50 µg/ml. Die deutliche Zunahme der Kapazität ( $C$  in nF) innerhalb ca. 100 min (vgl. Abb. 3-25: 1500 min) deutet auf eine Zerstörung der Zellmembran hin. Da sie linear von der Zellspreitung auf der Elektrodenfläche abhängt, ist die Kapazität am besten geeignet, um die Kinetik dieses toxischen Effektes des Saponinum album darzustellen (Xiao et al., 2002).

ECIS-Gerät	Applied Biophysics, Inc. ( <a href="http://www.biophysics.com">http://www.biophysics.com</a> )
Ausgangszellzahl	$10^3$ Zellen/ <i>Well</i> (im 8-well-Array)
Zelllinie	ECV 304
Kapazität $C_m$	(40 kHz)/ nF ( $C_m$ = membrane capacitance)
Inkubationszeit	0 min-2000 min (online, nicht invasiv)

Sämtliche ECIS-Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Joachim Wegener vom Institut für Biochemie der Universität Münster durchgeführt. Ein 8-well-Elektrodenarray ergibt 8 Messreihen. Es sind jeweils die Elektroden 1-4 und 5-8 zusammengruppiert (Abb. 3-25). Von jedem Experiment ist eine Auftragung der Kapazität bei 40 kHz (Abb. 3-25, links) und des Widerstands bei 400 Hz (Abb. 3-25, rechts) dargestellt. Die Kapazität ist hoch bei einer unvollständig bedeckten Elektrode wie z. B. bei nicht ganz gespreiteten Zellen. Ist die Elektrode komplett belegt, ergibt sich eine Kapazität  $< 10$  nF. Die Kapazität der Elektrode ist flächenabhängig und wird in der Einheit  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  angegeben. Sobald eine Zelle auf der Elektrode adhären ist, steht der von ihr bedeckte Bereich nicht mehr für einen kapazitiven Stromfluss zur Verfügung, folglich verringert sich die gemessene Kapazität um den gleichen Prozentsatz, dem die bedeckte Fläche relativ zur Gesamtfläche entspricht. Wenn z. B. eine

Zelle adhärert ist, nimmt sie in diesem Zustand eine Fläche von 10 % der gesamten Elektrodenfläche ein. Daraus ergibt sich eine gemessene Kapazität von nur noch 90 % einer völlig zellfreien Elektrode. Bei reinen Adhäsionsexperimenten kann man eine sukzessive Abnahme der Kapazität mit zunehmender Ausspreitung der Zellen auf der Oberfläche beobachten. Der Widerstand bei 400 Hz reflektiert etwa die Summe des Widerstandes, der aus dem Zell-Substrat Kontakt resultiert und dem der durch die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten auftritt. Durch einen Vergleich der Kapazität und des Widerstandes kann man den zeitlichen Verlauf dieser Parameter ableiten (Xiao & Luong, 2003). Werden die Membranen wie im vorgestellten Fall durch eine Saponinkonzentration von 50 µg/ml permeabilisiert (siehe Abb. 3-24), sind die Zellen keine Isolatorpartikel mehr und der Widerstand bricht zusammen bzw. die hier dargestellte Kapazität nimmt Werte an, wie man sie für eine leere Elektrode findet (Wegener et al., 2000).

Bei einer Impedanzmessung mit einer angelegten Kapazität von 40 kHz sinkt diese annähernd linear mit steigender Zellspreitung auf der Elektrodenoberfläche (Wegener et al., 1996). Die Diagramme im linken Teil der Abbildung 3-25, auf deren Ordinate als Einheit die Kapazität aufgetragen ist, stellen somit die Hemmung der Zellspreitung in Abhängigkeit von der Zeit (min) dar. Wie bereits die Experimente der getriggerten Toxizität gezeigt haben, ist in den ersten 24 h Inkubationszeit keine Proliferationshemmung festzustellen. Nach ca. 25 h zeichnet sich bezüglich der mit Saponin (3.0 µg/ml) und Agrostin (0.1/ 1.0/ 5.0 µg/ml) behandelten Zellen ein Anstieg der Kapazität ab, bei 20 ng/ml Agrostin ist dieser Effekt erst nach 60 h zu verzeichnen. Da erst nach einer Inkubationszeit von 25 h erste Veränderungen zu verzeichnen sind, entspricht dieses Ergebnis einem verzögerten Wirkungsmechanismus der RIPs.

Im Gegensatz zu Saponinen, die direkt innerhalb weniger Stunden die Zellmembran angreifen, handelt es sich hier um einen indirekten Zytotoxizitätsmechanismus, der entsprechend des zeitlichen Verlaufs der Proteinsynthese (G1/ S/ G2-Phase der Zelle; siehe Abschnitt 1.6) verläuft. Der Effekt ist entsprechend dieses Verzögerungseffektes im ECIS-Diagramm erst dann zu sehen, wenn die Zellmembran beschädigt ist und die Zelle die zur Aufrechterhaltung der Zellmembran notwendige Proteinproduktion nicht mehr durchführt. Die ECIS-Untersuchungen belegen hier erstmals online und nicht-invasiv, dass der vorgestellte toxische Mechanismus in einem indirekten Angriff der Zelle besteht und kooperativ, also nur bei gleichzeitiger Saponininkubation in subtoxischen Dosen abläuft. Die Saponinkontrolle (3 µg/ml) zeigt über den gesamten Messverlauf keine Veränderung der Kapazität, demzufolge ist mit dieser Methode nachgewiesen worden, dass bei der Saponinkonzentration von 3 µg/ml keine Membrantoxizität besteht (siehe Abb. 3-25).

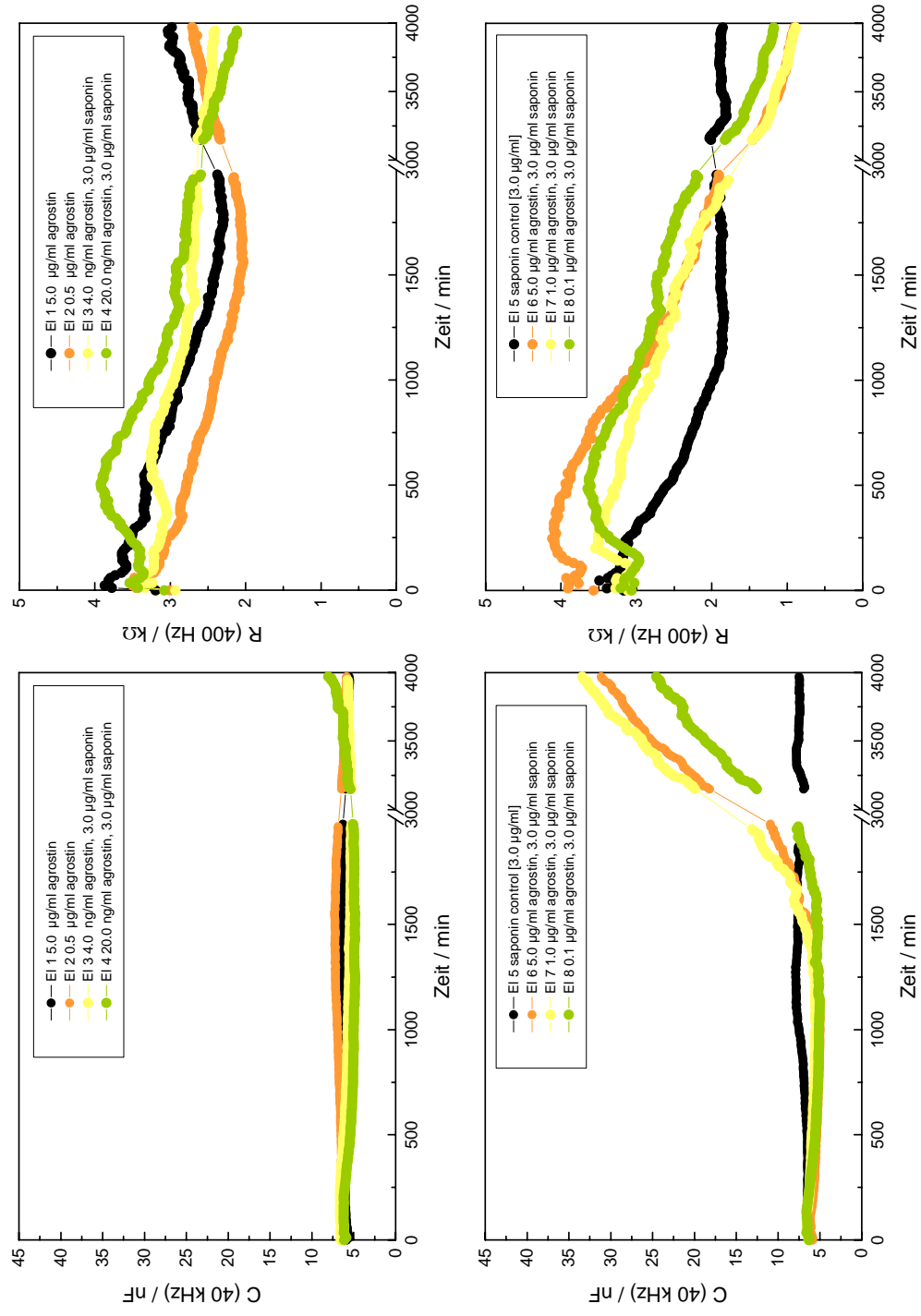


Abb. 3-25: ECIS-Untersuchungen (Erläuterungen s. nächste Seite)



**Abb. 3-25:** TT Zeitliche Entwicklung a) der Kapazität  $C_m$  (40 kHz)/ nF, die in Abhängigkeit von der Inkubationszeit die Spreitung des Zellmonolayers darstellt (links). und b) des Widerstands  $R_b$  (400 Hz)/ k $\Omega$ , der ein Maß für die Eigenschaft des gesamten Monolayers als Barriere ist. Diese Eigenschaften können von den Impedanzspektren eines intakten, konfluenten Zellmonolayers abgeleitet werden.

ECIS-Gerät	Applied Biophysics, Inc. ( <a href="http://www.biophysics.com">http://www.biophysics.com</a> )
Ausgangszellzahl	$10^3$ Zellen/ <i>Well</i> (im 8-well-Array)
Zelllinie	ECV 304
Widerstand ( $R_b$ )	(400 Hz)/ k $\Omega$ ( $R_b$ =barrier resistance)
Kapazität $C_m$	(40 kHz)/ nF ( $C_m$ =membrane capacitance)
Inkubationszeit	0 min-4000 min (online, nichtinvasiv)

Die von uns ermittelte Zytotoxizität für RIPs des Typs 1 ( $IC_{50}$ [Saponin und Agrostin]:  $5.7 \pm 1.7$  ng/ml; siehe Tab. 3-5) liegt in der Größenordnung des zellfreien Systems ( $IC_{50} < 18$  ng/ml; Stirpe et al., 1983). Dies lässt den Rückschluss zu, dass es sich beim Wirkungsmechanismus tatsächlich um den enzymatischen Prozess eines Ribosomen-inaktivierenden Proteins handelt und dass das Saponin die Funktion eines Haptomers bzw. einer zielzellbindenden Domäne wie der B-Kette des Ricins übernimmt (siehe Abb. 1-1). In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass in der Literatur belegt wird, dass Lectine mit verzweigten Kohlehydratketten eine stärkere Zelladhäsionsfähigkeit/ Zytotoxizität besitzen- Saponine mit verzweigter Kohlehydratkette, insbesondere am  $C_3$  des Aglykons weisen ebenfalls eine stärkere Aktivität auf (siehe Abb. 3-11).

Die Kinetik der in Abb. 3-24 und 3-25 dargestellten Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit der Proliferationshemmung bestätigt diese Hypothese. Der zeitliche Ablauf der Wachstumshemmung und die Lokalisation des fluoreszenzmarkierten Agrostins in der perinukleären Region des Endoplasmatischen Retikulums entsprechen der Hypothese einer ribosomalen Proteinsynthesehemmung, die in einem Zyklus von 24 h abläuft (siehe Abschnitt 1.4). Diese Kinetik konnte besonders gut durch die ECIS- Methode dargestellt werden, da hier die Kapazität [C] und der Widerstand [R] in direkter Abhängigkeit zur Zellproliferation stehen (Xiao & Luong, 2003) und bei einer toxischen Saponinkonzentration nach ca. 100 min Werte annehmen, wie man sie sonst für eine leere Elektrode findet (siehe Abb. 3-24). Der Widerstand und die Kapazität verhalten sich dabei umgekehrt proportional zueinander. Die Toxizitätsentwicklung ist in verschiedene Phasen gegliedert: eine Resorptionsphase, in der die intakte Zelle das Protein endozytotisch aufzunehmen vermag, nach ca. 24 h durch Ribosomenschädigung erste Biosynthese- und Metabolisierungseinschränkungen (siehe Abb. 3-25: eine steigende Kapazität, bzw. Zytotoxizität ist erst nach ca. 25 h sichtbar), die nach ca. 48 h zu mikroskopisch gut erkennbaren morphologischen Veränderungen und nach 72 h (siehe Abb. 3-2, 3-20 und 3-21) zum Absterben der gesamten Zellpopulation führen.

## 4 Schlussfolgerung

Die dargestellten Untersuchungen zur Manipulierung der Aufnahme des Agrostins in das Zytosol deuteten auf den Mechanismus einer rezeptorvermittelten Endozytose hin. Durch die immunfluoreszenzmikroskopischen Experimente konnte bei gleichzeitiger Saponininkubation endozytotisch aufgenommenes Agrostin bereits nach zwei Stunden Inkubationszeit im Zytosol dargestellt werden. Die ECIS-Untersuchungen zeigten, dass es sich nicht, wie es z. B. bei Saponinen der Fall ist, um einen direkten toxischen Effekt handelt, sondern um einen getriggerten Toxizitätsmechanismus, der erst nach ca. 24 h Inkubationszeit auftritt.

Wie bei den Proteinen (Agrostin aus *Agrostemmae semen* und Saporin aus *Saponariae semen*, beides Caryophyllaceae) besteht offenbar auch bei den Saponinen (die hier vorgestellten aktiven Saponine wurden ebenfalls aus Caryophyllaceae isoliert) eine Analogie zwischen ihrer chemotaxonomischen Zugehörigkeit und der unterschiedlichen Wirksamkeit. Dies führte zu einer synergistischen Toxizität einer Kombination dieser Substanzen. Erstmals wurde ein stärkerer zytotoxischer Effekt der Kombination von Saporin mit Gypsophilasaponin im Vergleich zu reinem Diphtheriatoxin beobachtet (Heisler et al., 2004).

Die Kenntnis des Transportschrittes durch die Zellmembran ist für eine Verwendung der RIPs z.B. zur Therapie von Tumoren von entscheidender Bedeutung (Kreitman & Pastan, 1998). Nach Operation, Strahlen- und oftmals mehrfacher Hochdosis-Chemotherapie besteht eine direkte Beziehung zwischen der Anzahl immer noch überlebender Tumorzellen und der Überlebensrate von Tumorpatienten. Eine Verlängerung der Überlebenszeit kann heute durch eine Chemotherapie nur etwa zur Hälfte erreicht werden. Demzufolge stellen Tumorzellen, die durch eine lokale Behandlung nicht vollständig entfernt werden können, ein erhebliches Problem in der Tumorthherapie dar. Diese Zellen können durch eine Immuntherapie zerstört werden, z. B. auch durch sogenannte Immunotoxine: Immunotoxine sind komplexe Makromoleküle mit 2 unterschiedlichen Komponenten (Barbieri et al., 2000).

Eine Komponente dient der Bindung an die Zielzelle. Dies wird zumeist durch monoklonale Antikörper, Zytokine oder lösliche Rezeptormoleküle erreicht. Die andere Komponente enthält das Toxin, das die Tumorzelle zerstören soll. Wünschenswert ist, dass das Immunotoxin von der Tumorzelle aufgenommen, anschließend die Toxinkomponente intrazellulär freigesetzt wird und nicht in die Blutbahn dissoziiert. Monoklonale Antikörper gegen zelluläre Oberflächenantigene stellen die am häufigsten verwendeten Bindungsstrukturen zur Herstellung von Immunotoxinen dar. Da noch keine ausschließlich

tumorspezifischen Antigene beschrieben sind, werden die Zielstrukturen auch auf normalen menschlichen Geweben exprimiert. Daher ist der Ausschluss von Kreuzreaktivitäten mit lebenswichtigen menschlichen Organen eine der wichtigsten Voraussetzungen bei der Entwicklung neuer Immunotoxine. Insbesondere Antigene auf soliden Tumorzellen sind häufig auf anderen menschlichen Zellen vorhanden, so dass sich der Schwerpunkt der Immunotoxinforschung bisher auf Leukämien und Lymphome konzentrierte, da bei diesen Erkrankungen zur Zeit spezifischere Liganden zur Verfügung stehen. Wird ein Zytokin, ein löslicher Rezeptor oder ein Antikörperfragment gegen einen löslichen Rezeptor als Bindungsstruktur verwendet, muss berücksichtigt werden, dass die löslichen komplementären Moleküle des Patienten die Aktivität des Immunotoxins kompetitiv inhibieren und daraus reduzierte *in vivo*-Effekte resultieren können.

Mit der Entwicklung neuer, vor allem molekularbiologischer Methoden gewannen in den letzten Jahren rekombinante Fusionsproteine an Bedeutung (Heisler et al., 2003). Dadurch können die Proteotoxine modifiziert werden und als Liganden neben natürlichen Proteinen wie Interleukin 2, Transferrin (Ippoliti et al., 1995) und vollständigen Antikörpern auch Antikörperfragmente (Fab, Fv) eingesetzt werden (Keller & Fuchs, 2002).

Bei toxikologischen Untersuchungen unterschiedlicher Toxinkonjugate wurde eine synergistische Wirkung bei der Kombination verschiedener Komponenten festgestellt, bei dem die eingesetzten Toxine im Zytosol offensichtlich bisher unbekannte Wege beschreiten (Ippoliti et al., 1998). Mittlerweile hat bereits ein Fusionsprotein, Ontak<sup>TM</sup>, die Zulassung erhalten, andere werden bereits in klinischen Studien Phase III getestet. Trotz dieser positiven Entwicklung existieren noch immer Probleme, z.B. die unspezifische Wirkung bzw. Schädigung normal differenzierter Zellen und eine nicht ausreichend effiziente Aufnahme der Fusionsproteine in die Zielzelle.

Beide Probleme könnten nun durch ein neues Verfahren gelöst werden: eine Kombinationstherapie, bei der Ligand-tragende Wirkstoffe wie Immunotoxine (Typ 1 RIP Saporin-3, epidermal growth factor (EGF) und ein molekularer Adapter in Kombination mit Triterpensaponinen (Gypsophilasaponin) verabreicht werden. Agrostin und das strukturverwandte Saporin, ebenfalls ein RIP vom Typ I aus den Samen einer Caryophyllacee (*Saponaria officinalis* L.; Stirpe et al., 1983), zeigten im dargestellten Beispiel den gleichen Synergismus.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Saporin führten im Frühjahr 2004 zu weitergehenden *in vitro*-Experimenten mit rekombinant hergestelltem his-Saporin 3 gekoppeltem Immuno-adaptertoxin in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Fuchs an der Charité. Im

Vordergrund dieser Untersuchungen stand die Überlegung, eine Anwendbarkeit der Saponine als Enhancer für Immunotoxine in der Krebstherapie zu überprüfen, da diese häufig mit Typ I-RIPs wie Saporin oder der enzymatisch aktiven A-Kette des Ricins (RTA) gekoppelt werden (Barbieri et al., 2000). Das große Potential von Saponinen als Kombinations-therapeutika, im hier dargestellten Fall mit tumortherapeutischen Fusionsproteinen, wird durch in vitro-Untersuchungen belegt, die zu einem Synergismus von Saponinen mit auf Saporin basierenden Immunotoxinen führten (Heisler et al., 2004).

Durch ein 2004 patentiertes Verfahren, einer Kombination von Gypsophilasaponin mit auf Saporin (RIP I) basierenden Immunoadaptiertoxinen, ist *in vitro* eine Wirkungsverstärkung um vier Zehnerpotenzen realisiert worden, was eine erhebliche Dosisverringering bei gleicher Wirksamkeit und vermindertem Nebenwirkungsspektrum gewährleistet.

Es wird die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein, den Transportmechanismus des Toxins in die Zelle zu beschreiben, sowie die Struktur des Agrostins aufzuklären, um die Wechselwirkungen mit bestimmten Strukturmerkmalen von Saponinen und die Affinität zu Oberflächenrezeptoren der Zielzelle besser erklären zu können.

## 5 Zusammenfassung

- Die Kombination eines untoxischen Ribosomen-inaktivierenden Proteins wie Agrostin oder Saporin (RIP Typ I) und eines bisdesmosidischen Triterpensaponins mit Gypsogenin oder Quillajasäure als Aglykon erwies sich im Zytotoxizitätstest als ebenso toxisch wie Agrostin im zellfreien System (Retikulozytenlysatstest).
- Synergistische Effekte der Kombination Saponin und RIP I waren besonders ausgeprägt, wenn beide Substanzen eine chemotaxonomische Verwandtschaft (hier: Saponine und Agrostin/ Saporin aus Caryophyllaceae) zeigten.
- Das bisdesmosidische Triterpensaponin aus *Helianthus annuus* L. mit Echinocystsäure als Aglykon (fehlende Aldehydfunktion an Pos. C<sub>4</sub>) unter identischen Bedingungen zeigte eine wesentlich geringere *in vitro*-Aktivität.
- Modifikationen der Zuckerkette an Position C<sub>3</sub> des Aglykons hatten ebenfalls Auswirkungen auf die Aktivität der Saponine: Monosaccharide an Pos. C<sub>3</sub>, eine fehlende C<sub>3</sub>-Glucuronsäure, Monodesmosidische Saponine und das nach Hydrolyse entstandene Aglykon Gypsogenin zeigten eine signifikant geringere kombinatorische Aktivität.
- Der Aufnahmemechanismus zeigte eine ähnliche Kinetik wie eine rezeptorvermittelte Endozytose (siehe ECIS-Untersuchungen).
- Die Temperaturabhängigkeit und die Kinetik der Toxinaufnahme deuten darauf hin, dass der Agrostin-Aufnahmemechanismus in einer rezeptorvermittelten Endozytose besteht, die wesentlich schneller abläuft als z.B. eine Phagozytose oder Pinozytose.
- In dieser Arbeit wird beschrieben, wie ein untoxisches RIP Typ I trotz fehlender Affinität zur Zielzelle mit Hilfe strukturell definierter Saponine an die Zelloberfläche bindet und nach weniger als 3 Stunden Inkubationszeit endozytotisch in das Zytosol eingeschleust wird.
- Erstmals wurde ein stärkerer zytotoxischer Effekt der Kombination von Saporin und Gypsophilasaponin im Vergleich zu reinem Diphtheriatoxin (Positivkontrolle) beobachtet.
- Bei Substitution des Agrostins durch die Toxine Saporin, Nigrin b (nicht toxisches RIP Typ II aus *Sambucus nigra* L., Adoxaceae), RTA (enzymatisch aktive A-Kette aus Ricin) und DTA (A-Kette aus Diphtheriatoxin) übertraf insbesondere das hochreine,

rekombinant hergestellte his-Saporin 3 in Kombination mit Gypsophilasaponin die Zytotoxizität des Diphtheriatoxins (Positivkontrolle).

- Es wurde ein Zusammenhang zwischen der systematischen und chemotaxonomischen Einordnung der Arten, aus denen die kombinatorisch wirksamen Toxine isoliert wurden (Agrostin aus *Agrostemmae semen* und Saporin aus *Saponariae semen*, Caryophyllaceae) und ihren toxischen Inhaltsstoffen festgestellt.
- Bei Toxinen anderer Herkunft zeigten RTA und das Typ II RIP Nigrin b eine schwächere Aktivität in Kombination mit Saponin.
- Microcystin, DTA und das FAS-Tripeptid, Toxine mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus, zeigten in Kombination mit Saponin kaum noch zytotoxische Aktivität.
- Calcium-assoziierte Effekte scheinen beim toxischen Effekt der Kombination von Saponin und Agrostin keine Rolle zu spielen.
- Offensichtlich läuft der Toxinadhäsionsschritt unterschiedlich zu dem der üblichen, kohlehydratassoziierten Lectine ab (Untersuchungen mit Neuraminidase- und Zuckerpräinkubation).
- Der Aufnahmemechanismus konnte durch eine ca. dreistündige Vorinkubation von Agrostin und Saponin getriggert werden.
- Durch Latrunculin A wurde keine vollständige Aufhebung der getriggerten Toxizität erreicht. Dies spricht für einen weiteren, alternativen endozytotischen Effekt.
- Durch Untersuchungen an unterschiedlichen Zelllinien konnte ein hochspezifischer Mechanismus bezüglich der Toxinaufnahme bei lediglich einer Zellart wie der ECV 304-Zelllinie ausgeschlossen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

Allayee H, Laffitte BA, Lusi AJ. An absorbing study of cholesterol. *Science* 2000; **290**: 1709-11 [0036-8075].

Ariansen S, Afanasiev BN, Moskaug JO et al. Membrane translocation of diphtheria toxin A-fragment: role of carboxy-terminal region. *Biochemistry* 1993; **32**: 83-90 [0006-2960].

Armah CN, Mackie AR, Roy C, Price K, Osbourn AE, Bowyer P et al. The membrane-permeabilizing effect of Avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. *Biophys J* 1999; **76**: 281-90 [0006-3495].

Au TK, Collins RA, Lam TL, Ng TB, Fong WP, Wan DC. The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. *FEBS Lett* 2000; **47**: 169-72 [0014-5793]

Bader G. Pharmakologische und biopharmazeutische Bewertung von Triterpensaponinen. *Pharmazie* 1994; **49**: 391-400 [0031-7144].

Bagga S, Hosur MV, Batra JK. Cytotoxicity of ribosome-inactivating protein saporin is not mediated through  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor. *FEBS Lett* 2003; **541**: 16-20 [0014-5793].

Bangham AD, Horne RW. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature* 1962; **196**: 952-3 [0028-0836].

Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1154**: 237-82 [0006-3002].

Barbieri L, Bolognesi A, Valbonesi P, Polito L, Olivieri F, Stirpe F. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of immunotoxins containing ribosome-inactivating proteins. *J Drug Target* 2000; **8**: 281-8 [1061-186X].

Barbieri L, Ciani M, Girbes T, Liu WY, Van Damme EJ, Peumans WJ, Stirpe F. Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett* 2004; **563**: 219-22 [0014-5793].

- Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acid Res* 1997; **25**: 518-22 [0305-1048].
- Barr IG, Sjölander A, Cox JC. ISCOMS and other saponin-based adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; **32**: 247-71 [0169-409X].
- Basha, SMM, Roberts, RM. The glycoproteins of plant seeds. Analysis by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and by their lectin-binding properties. *Plant Physiol* 1981; **67**: 936-9 [0032-0889].
- Battelli MG, Citores L, Buonamici L, Ferreras JM, Benito FM, Stirpe F, Gírbés T. Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: comparison with ricin. *Arch Toxicol* 1996; **71**: 360-4 [0340-5761].
- Behboudi S, Morein B, Villacres-Eriksson M. In vivo and in vitro induction of IL-6 by Quillaja saponaria molina triterpenoid formulations. *Cytokine* 1997; **9**: 682-7 [1043-4666].
- Blöcher E. Untersuchungen zur biologischen und pharmakologischen Wirksamkeit der Aminosäure L-Orcylalanin aus *Agrostemma githago* L. und einiger Derivate. *Dissertation Frankfurt a. M.* 1982.
- Bohn JA, BeMiller JN. (1→3)- $\beta$ -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr Polym* 1995; **28**: 3-14 [0144-8617].
- Bolognesi A, Tazzari PL, Olivieri F, Polito L, Falini B, Stirpe F. Induction of apoptosis by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins. *Int J Cancer* 1996; **68**: 349-55 [0020-7136].
- Bomford R, Stapleton M, Winsor S, Beesley JE, Jessup EA, Price KR, Fenwick GR. Adjuvanticity and ISCOM formation by structurally diverse saponins. *Vaccine* 1992; **10**: 572-7 [0264-410X].
- Boukamp P, Petrussevska D, Breitkreutz J, Hornung A, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid humankeratinocyte line. *J Cell Biol* 1988; **106**: 761-71 [0171-9335].
- Boyd WC, Slapeigh E. Antigenic relations of blood group antigen as suggested by test with lectins. *Immunology* 1954; **73**: 226-31 [0022-1767].



Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-54 [0003-2697].

Brooke JS, Cha JH, Eidels L. Diphtheria toxin: receptor interaction: association, dissociation and effect of pH. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **248**: 297-302 [0006-291X].

Bubenik J, Baresova M, Viklicky V, Jakoubkova J, Sainerova H, Donner J. Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer* 1973; **11**: 765-73 [0020-7136].

Carnicelli D, Brigotti M, Alvergnà P, Pallanca P, Sperti S, Montanaro L. Cofactor requirement of ribosome-inactivating proteins from plants. *J Exp Bot* 1997; **48**: 1519-23 [1460-2431].

Cassidy JT, Jourdian G, Roseman S. The sialic acids. *J Biol Chem* 1965; **240**: 3501-6 [0021-9258].

Cavallaro U, Nykjaer A, Nielsen M, Soria MR. Alpha 2-macroglobulin receptor mediates binding and cytotoxicity of plant ribosome-inactivating proteins. *Eur J Biochem* 1995; **232**: 165-71 [0014-2956].

Chan WY, Huang H, Tam SC. Receptor-mediated endocytosis of trichosanthin in choriocarcinoma cells. *Toxicology* 2003; **186**: 191-203 [0300-483X].

Chao AC, Nguyen JV, Broughall M, Recchia J, Kensil CR, Daddona PE, Fix JA. Enhancement of intestinal model compound transport by DS-1, a modified Quillaja saponin. *J Pharm Sci* 1998; **87**: 1395-9 [0022-3549].

Chong MWK, Gu KD, Lam P KS, Yang M, Fong WF. Study on the cytotoxicity of microcystin-LR on cultured cells. *Chemosphere* 2000; **41**: 143-7 [0045-6535].

Citores L, Munoz R, De Benito FM, Iglesias R, Ferreras JM, Girbes T. Differential sensitivity of HELA cells to the type 2 ribosome-inactivating proteins ebulin 1, nigrin b and nigrin f as compared with ricin. *Cell Mol Biol* 1996; **4**: 473-6 [0145-5680].

Collier RJ, Kandel J. Structure and activity of diphtheria toxin.I. Thiol-dependent dissociation of a fraction of toxin into enzymatically active and inactive fragments. *J Biol Chem* 1971; **246**: 1496-503 [0021-9258].

- D'Silva PR, Lala AK. Organization of diphtheria toxin in membranes. *J Biol Chem* 2000; **275**: 11771-7 [0021-9258].
- De Klerk GJ, Engelen D. Assembly of Agrostemma githago storage proteins and their precursor proteins into oligomers. *Biochem J* 1985; **229**: 269-72 [0264-6021].
- De Oliveira CA, Kashman Y, Mantovani B. Effects of latrunculin A on immunological phagocytosis and macrophage spreading-associated changes in the F-actin/G-actin content of the cells. *Chem Biol Int* 1996; **100**: 141-53 [0009-2797].
- De Oliveira CA, Mantovani B. Latrunculin A is a potent inhibitor of phagocytosis by macrophages. *Life Sci* 1988; **43**: 1825-30 [0024-3295].
- Dirks WG, MacLeod RA, Drexler HG. ECV 304 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): cell line cross- contamination at source. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999; **35**: 558-9 [0883-8364].
- Drazin R, Kandel J, Collier RJ. Structure and activity of diphtheria toxin.II. Attack by trypsin at a specific site within the intact toxin molecule. *J Biol Chem* 1971; **246**: 1504-10 [0021-9258].
- Endo Y, Chan YL, Lin A, Tsurugi K, Wool IG. The cytotoxins alpha-sarcin and ricin retain their specificity when tested on a synthetic oligoribonucleotide (35-mer) that mimics a region of 28 S ribosomal ribonucleic acid. *J Biol Chem* 1988; **263**: 7917-20 [0021-9258].
- Endo Y, Tsurugi K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J Biol Chem* 1987; **262**: 8128-30 [0021-9258].
- Fittipaldi A, Ferrari A, Zoppé M, Arcangeli C, Pellegrini V, Beltram V, Giacca M. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 tat fusion proteins. *J Biol Chem* 2003; **278**: 34141-9 [0021-9258].
- Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit J Nutr* 2002; **88**: 587-605 [0007-1145].
- Frankel AE, Kreitman RJ, Sausville EA. Targeted toxins. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 326-34 [1078-0432].

Frechet D, Christ B, du Sorbier BM, Fischer H, Vuilhorgne M. Four triterpenoid saponins from dried roots of *Gypsophila* species. *Phytochem* 1991; **30**: 927-31 [0031-9422].

Gaidi G, Correia M, Chauffert B, Beltramo J, Wagner H, Lacaille-Dubois MA. Saponins-mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxicity in human colon cancer cells. *Planta Med* 2002; **68**: 70-2 [0032-0943].

Gaidi G, Miyamoto T, Rustaiyan A, Laurens V, Lacaille-Dubois MA. Two new biologically active triterpene saponins from *Acanthophyllum squarrosum*. *J Nat Prod* 2000; **63**: 1497-502 [0163-3864].

Gaidi G, Miyamoto T, Lacaille-Dubois MA. Junceosides A-C, new triterpene saponins from *Arenaria juncea*. *J Nat Prod* 2001<sup>a</sup>; **64**: 1533-7 [0163-3864].

Gaidi G, Miyamoto T, Rustaiyan, Lacaille-Dubois MA. Three new acylated triterpene saponins from *Acanthophyllum squarrosum*. *J Nat Prod* 2001<sup>b</sup>; **64**: 920-4 [0163-3864].

Giaever I, Keese CR. A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 1993; **366**: 591-2 [0028-0836].

Girbes T, Ferreras JM, Iglesias R, Citores L, De Torre C, Carbajales ML et al. Recent advances in the uses and applications of ribosome-inactivating proteins from plants. *Cell Mol Biol* 1996; **42**: 461-71 [0145-5680].

Glaueri AM, Dingie JT, Lucy JA. Action of saponins on biological membranes. *Nature* 1962; **196**: 953 [0028-0836].

Gogelein H, Huby A. Interaction of saponin and digitonin with black lipid membranes and lipid monolayers. *Biochim Biophys Acta* 1984; **773**: 32-8 [0006-3002].

Griffiths GD, Lindsay CD, Upshall DG. Examination of the toxicity of several protein toxins of plant origin using bovine pulmonary endothelial cells. *Toxicology* 1994; **90**: 11-27 [0300-483X].

Guo S, Kenne L. Structural studies of triterpenoid saponins with new acyl components from *Quillaja saponaria* Molina. *Phytochem* 2000; **55**: 419-28 [0031-9422].

Haines TH. Water transport across biological membranes. *FEBS Lett* 1994; **34**: 115-22 [0014-5793].

Hebestreit P, Melzig MF. Cytotoxic activity of the seeds from *Agrostemma githago* L. var. *githago*. *Planta Med* 2003; **10**: 921-5 [0032-0943].

Hebestreit P, Melzig MF, Czygan FC. Die Kornrade, eine Blume besonderer Art. *Z Phytother* 2003; **24**: 249-53 [0722-348X].

Hebestreit P. Untersuchungen zur Toxizität von *Agrostemma githago*. *Diplomarbeit Berlin* 1999.

Heisler I, Sutherland M, Bachran C, Hebestreit P, Schnitger A, Melzig MF, Fuchs H. Combined application of saponin and immunotoxins enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells more than ten thousand fold. *J Clin Invest* 2004 [0271-9142] (eingereicht).

Heisler I, Keller J, Tauber R, Sutherland M, Fuchs H. A cleavable adapter to reduce nonspecific cytotoxicity of recombinant immunotoxins. *Int J Cancer* 2003; **103**: 277-82 [0020-7136].

Hiegemann M, Duddeck H, Bader G, Hiller K. Structural investigation and conformational analysis of helianthosid 2, a saponin from *Helianthus annuus* L. *Magn Reson Chem* 1995; **33**: 337-41 [0749-1581].

Higuchi R, Tokimitsu Y, Fujioka T, Komori T, Kawasaki T, Oakenfull DG. Structure of the desacylsaponins obtained from the bark of *Quillaja saponaria*. *Phytochem* 1987; **26**: 229-35 [0031-9422].

Hiller K, Woitke HD, Lehmann G. Über die Saponine von *Astrantia major* L. *Pharmazie* 1973; **28**: 391-7 [0031-7144].

Hoffmann-Bohm K. *Agrostemma githago* L. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis* 1992; **5** Springer-Verlag Berlin: 142-5 [3-540-05124-4].

Hughes SE. Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: use in an in vitro model of angiogenesis. *Exp Cell Res* 1996; **225**: 171-85 [0014-4827].

Ippoliti R, Ginobbi P, Lendaro E, D'Agostino I, Benedetti PA, Brunori M, Citro G. The effect of monensin and chloroquine on the endocytosis and toxicity of chimeric toxins. *Cell Mol Life Sci* 1998; **54**: 866-75 [1420-682X].

Ippoliti R, Lendaro E, Belleli A, Brunori M. A ribosomal protein is specifically recognized by saporin, a plant toxin which inhibits protein synthesis. *FEBS Lett* 1992; **298**: 145-8 [0014-5793].

Ippoliti R, Lendaro E, D'Agostino I, Fiani ML, Guidarini D, Vestri S, Benedetti PA, Brunori M. A chimeric saporin-transferrin conjugate compared to ricin toxin: role of the carrier in intracellular transport and toxicity. *Faseb J* 1995; **9**: 1220-5 [0892-6638].

Ippoliti R, Lendaro E, Benedetti PA, Torrisi MR, Belleudi F, Carpani D, Soria MR, Fabbrini MS. Endocytosis of a chimera between human pro-urokinase and the plant toxin saporin: an unusual internalization mechanism. *Faseb J* 2000; **14**: 1335-44 [0892-6638].

Kamstrup S, San Martin R, Doberti A, Grande H, Dalsgaard K. Preparation and characterisation of Quillaja saponin with less heterogeneity than Quil-A. *Vaccine* 2000; **18**: 2244-9 [0264-410X].

Katzin BJ, Collins EJ, Robertus JD. Structure of ricin A-chain at 2.5Å. *Proteins* 1991; **10**: 251-9 [0887-3585].

Keller J, Fuchs H. Entwicklung molekularer Adapter zur Optimierung von Immunotoxinen. *Dissertation.Freie Universität Berlin* 2002.

Kensil CR, Kammer R. QS-21: A water-soluble triterpene glycoside adjuvant. *Exp Opin Invest Drugs* 1998; **7**: 1475-82 [1354-3784].

Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria molina cortex. *J Immunol* 1991; **146**: 431-437 [0022-1767].

Kensil CR. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1996; **13**: 1-55 [0743-4863].

Kersten GFA, Spiekstra A, Beuvery EC, Crommelin DJA. On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (ISCOMs). *Biochem Biophys Acta* 1991; **1062**: 165-71 [0006-3002].

Kirchhausen T. Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000; **1**: 187-98 [1471-0072]

Kochetkov NK, Khorlin AY, Ovodov Y. Structure of gypsoside, a triterpenic saponin from *Gypsophila pacifica*. *Tetrahedron Lett* 1963; **8**: 477-82 [0040-4020].

Kreitman RJ, Pastan I. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; **31**: 53-88 [0169-409X].

Kruskal N. Ueber *Agrostemma githago* L. *Dissertation Universität Dorpat* 1891.

Lacaille-Dubois MA, Wagner H. Bioactive saponins from plants: an update. in: *Studies in Natural Products Chemistry Series* (Ed: Atta-ur-Rhaman), *Elsevier Science* 2000; **21**: 633-87 [CAN 133:190438].

Lacaille-Dubois MA,. Biologically and active saponins from plants: recent advances. Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants. in: *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* (Ed: Oleszek W, Marston A), *Kluwer Academic Publishers* 2000; **45**: 205-18 [7923-6023].

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-5 [0028-0836].

Langer M, Rothe M, Eck J, Mockel B, Zinke H. A nonradioactive assay for ribosome-inactivating proteins. *Anal Biochem* 1996; **243**: 150-3 [0003-2697].

Leung YM, Ou YJ, Kwan, CY, Loh TT. Specific interaction between tetrandrine and Quillaja saponins in promoting permeabilisation of plasma membrane in human leukemic HL-60 cells. *Biochem Biophys Acta* 1997; **1325**: 318-28 [0006-3002].

Lewin L. *Agrostemma githago* L. Gifte und Vergiftungen, *Lehrbuch der Toxikologie*. Karl F. Haug Verlag Ulm/ Donau **5**: 1928; 649-50 [3-7760-1286-2].

Lincz L. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immun and Cell Bio* 1998; **76**: 1-19 [0818-9641].

Lindgren M, Hallbrink M, Prochiantz A, Langel U. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* 2000; **21**: 99-103 [0165-6147].

Marciani DJ, Pathak AK, Reynolds RC, Seitz L, May RD. Altered immunomodulating and toxicological properties of degraded Quillaja saponaria molina saponins. *Int Immunopharm* 2001; **1**: 813-8 [1567-5769].

Marciani DJ, Press JB, Reynolds RC, Pathak AK, Pathak V, Gundy LE, Farmer JT, Koratich MS et al. Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity. *Vaccine* 2000; **18**: 3141-51 [0264-410X].

Marzell H. Die Kornrade. *Wörterbuch der deutschen Pflanzennamen*. S. Hirzel Verlag Leipzig 1943; **1**: 154 [0-86093-224-9]

Melzig MF, Bader G, Loose R. Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins. *Planta Med* 2001; **67**: 43-8 [0032-0943].

Montford W, Villafranca JE, Monzingo AF, Ernst SR, Katzin B, Rutenber E, Xuong NH, Hamlin R, Robertus JD. The Three-dimensional Structure of Ricin at 2.8Å. *J Biol Chem* 1987; **262**: 5398-403 [0021-9258].

Morein B. The ISCOM antigen-presenting system. *Nature* 1988; **322**: 287 [0028-0836].

Morton WM, Ayscough KR, McLaughlin PJ. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nature Cell Biol* 2000; **2**: 376-8 [1465-7392].

Moskaug JO, Sletten K, Sandvig K, Olsnes S. Translocation of diphtheria toxin A-fragment to the cytosol. Role of the site of interfragment cleavage. *J Biol Chem* 1989; **264**: 15709-13 [0021-9258].

Moskowitz HS, Heuser J, McGraw TE, Ryan TA. Targeted Chemical Disruption of Clathrin Function in Living Cells. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 4437-47 [0270-7306].

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55-63 [0022-1759].

Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000; **100**: 71-8 [0092-8674]

Olsnes S. Closing in on ricin action. *Nature* 1987; **328**: 474-5 [0028-0836].

Pappenheimer AM. Diphtheria toxin I: Isolation and characterization of a toxic protein from *C. diphtheriae* filtrates. *J Biol Chem* 1937; **125**: 543-53 [0021-9258].

Park SW, Stevens NM, Vivanco JM. Enzymatic specificity of three ribosome-inactivating proteins against fungal ribosomes, and correlation with fungal activity. *Planta* 2002; **216**: 227-34 [0032-0935].

Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 2002; **3**: 311-20 [1398-9219].

Pillion DJ, Amsden JA, Kensil CR, Recchia J. Structure-function relationship among Quillaja saponins serving as excipients for nasal and ocular delivery of insulin. *J Pharm Sci* 2000; **85**: 518-24 [0022-3549].

Plohmman B, Bader G, Hiller K, Franz G. Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins. *Pharmazie* 1997; **52**: 953-7 [0031-7144].

Price KR, Johnson IT, Fenwick GR. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feeding stuffs. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1987; **26**: 127-35 [1040-8398].

Recchia J, Lurantos MHA, Amsden JA, Storey J, Kensil CR. A semisynthetic Quillaja saponin as a drug delivery agent for aminoglycoside antibiotics. *Pharm Res* 1995; **12**: 1917-23 [0724-8741].

Rhodes J, Chen H, Hall SR, Beesley JE, Jenkins DC, Collins P et al. Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs. *Nature* 1995; **377**: 71-5 [0028-0836].

Rhodes J. Evidence for an intercellular covalent reaction essential in antigen-specific T cell activation. *J Immunol* 1989; **143**: 1482-9 [0022-1767].

Roncuzzi L, Gasperi-Campani A. DNA-nuclease activity of the single-chain ribosome-inactivating proteins dianthin 30, saporin 6 and gelonin. *FEBS Lett* 1996; **1**: 16-20 [0014-5793].

Rönnberg B, Fekadu M, Behboudi S, Kenne L, Morein B. Effects of carbohydrate modification of Quillaja saponaria Molina QH-B fraction on adjuvant activity, cholesterol-binding capacity and toxicity. *Vaccine* 1997; **15**: 1820-6 [0264-410X].

Roux E, Yersin A. Contribution à l'étude de la diphtérie. *Annales de l'Institut Pasteur* 1888; **12**: 629-61 [0924-4204].

Sasaki S, Sumino K, Hamajima K, Fukushima J, Ishii N, Kawamoto S, Mohri H, Kensil CR, Okuda K. Induction of systemic and mucosal immune responses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA vaccine formulated with QS-21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes. *J Virol* 1998; **72**: 4931-9 [0022-538X].



Savino C, Federici L, Ippoliti R, Lendaro E, Tsernoglou D. The crystal structure of saporin SO6 from *Saponaria officinalis* and its interaction with the ribosome. *FEBS Lett* 2000; **470**: 239-43 [0014-5793].

Schatz G, Dobberstein B. Common principles of protein translocation across membranes *Science* 1996; **271**: 1519-26 [0036-8075]

Scheller A, Melzig M, Oehlke J. Induction of caspase-8 in human cells by the extracellular administration of peptides containing a C-terminal SLV sequence. *J Pept Sci* 2002; **8**: 29-34 [1075-2617].

Schulz J, Dettlaff S, Fritzsche U, Harms U, Schiebel H, Derer W, Fusenig NE, Hülsen A, Böhm M. The amidoblack assay: a simple and quantitative multipurpose test of adhesion, proliferation and cytotoxicity in microplate cultures of keratinocytes (HaCat) and other cell types growing adherently or in suspension. *J Immunol Meth* 1994; **3**: 1-13 [0022-1759].

Schwarze SR, Dowdy SF. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci* 2000; **21**: 45-8 [0165-6147].

Seeman P. Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and drug-induced lysis. *Fed Proc* 1974; **33**: 2116-24 [2165-2170].

Shogomori H, Brown DA. Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol Chem* 2003; **84**: 1259-63 [1431-6730].

Siepmann C, Bader G, Hiller K, Wray V, Domke T, Nimtz M. New saponins from the seeds of *Agrostemma githago* L. *Planta Med* 1998; **64**: 159-64 [0032-0943].

Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science* 2000; **290**: 1721-5 [0036-8075].

Sjolander A, Cox JC, Batt IG. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J Leukoc Biol* 1998; **64**: 713-23 [0741-5400].

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; **150**: 76-85 [0003-2697].

So HS, Yoon HS, Choi DY, Kwon YS, Ryu WS. Effect of a novel saponin adjuvant derived from *Quillaja saponaria* on the immune response to recombinant hepatitis B surface antigen. *Mol Cells* 1997; **7**: 178-86 [1016-8478].

Soltysik S, Wu JY, Recchia J, Wheeler DA, Newman MJ, Coughlin RT, Kensil CR. Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. *Vaccine* 1995; **13**: 1403-10 [0264-410X].

Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Groweiss A. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 1983; **219**: 493-5 [0036-8075].

Stirpe F, Gasperi-Campani A, Barbieri L, Falasca A, Abbondanza A, Stevens WA. Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis*, *Agrostemma githago*, *Asparagus officinalis* and from the latex of *Hura crepitans*. *Biochem J* 1983; **216**: 617-25 [0264-6021].

Sung MK, Kendall CW, Rao AV. Effect of soybean saponins and gypsophila saponin on morphology of colon carcinoma cells in culture. *Food Chem Toxicol* 1995; **33**: 357-66 [0278-6915].

Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, Mukai K, Goto T. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990; **26**: 265-74 [0883-8364].

Tan, N, Zhou J, Zhao S. Advances in structural elucidation of glucuronide oleanane-type triterpene carboxylic acid 3, 28-O-bisdesmosides (1962-1997). *Phytochem* 1999; **52**: 153-92 [0031-9422].

Teng H, Wilkinson RS. Clathrin-mediated endocytosis near active zones in snake motor boutons. *J Physiol* 2000; **20**: 7986-93 [1529-2401].

Teng H, Wilkinson RS. ‚Delayed‘ endocytosis is regulated by extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in snake motor boutons. *J Physiol* 2003; **551**: 103-14 [0022-3751].

Teuscher E, Lindequist U. *Biogene Gifte*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York **2**: 1994; 220-46 [3-437-30747-9].

Tschesche R, Schulze H. Über das Hauptsaponin der Kornrade (*Agrostemma githago* L.). *Chem Ber* 1974; **107**: 2710-9 [0009-2940].

Tschesche R, Wulff G. Chemie und Biologie der Saponine. in: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe (Ed: Herz W, Grisebach H, Kirby GW). *Springer-Verlag Wien* 1973; **30**: 461-606 [3211810625].

Umata T, Mekada E. Diphtheria toxin translocation across endosome membranes. A novel cell permeabilization assay reveals new diphtheria toxin fragments in endocytotic vesicles. *J Biol Chem* 1998; **273**: 8351-9 [0021-9258].

Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD, Fidler IJ. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res* 1991; **51**: 3062-6 [0008-5472].

Vandenbussche F, Desmyter S, Marialibera C, Proost P, Peumans WJ, Van Damme EJM. Analysis of the *in planta* antiviral activity of elderberry ribosome-inactivating proteins. *Eur J Biochem* 2004; **271**: 1508-15 [0014-2956].

Wegener J, Keese CR, Giaever I. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Exp Cell Res* 2000; **259**: 158-66 [0014-4827].

Wegener J, Sieber M, Galla HJ. Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces. *J Biochem Biophys Methods* 1996; **32**: 151-70 [0165-022X].

Wu JY, Gardner BH, Murphy CI et al. Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. *J Immunol* 1992; **148**: 1519-25 [0022-1767].

Xiao C, Lachance B, Sunahara G, Luong J. Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing: concentration and time response function approach. *Anal Chem* 2002; **74**: 5748-53 [0003-2700].

Xiao C, Luong J. On-line monitoring of cell growth and cytotoxicity using cell-substrate impedance sensing (ECIS). *Biotechnol Prog* 2003; **19**: 1000-5 [8756-7938].

Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* 1978; **15**: 245-50 [0092-8674].

Yanagisawa J, Takahashi M, Kanki H, Yano-Yanagisawa H, Tazunoki T, Sawa E et al. The molecular interaction of Fas and FAP-1. *J Biol Chem* 1997; **272**: 8539-45 [0021-9258].

Zhang J. Use of biotinylated NAD to label and purify ADP-ribosylated proteins. *Methods Enzymol* 1997; **280**: 255-65 [0076-6879].

Zhang P, Yang QB, Marciani DJ, Martin M, Clements JD, Michalek SM, Katz J. Effectiveness of the quillaja saponin semi-synthetic analog GPI-0100 in potentiating mucosal and systemic responses to recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. *Vaccine* 2003; **21**: 4459-71 [0264-410X].

## Publikationsverzeichnis

### Patentschrift

Fuchs H, Sutherland M, Bachran C, Heisler I, Melzig MF, Hebestreit P.  
Kombinierte Verabreichung eines zielzellspezifischen Ligand tragenden Wirkstoffes und eines Saponins. (europ. Patent-Nr. 04 016 497.2)

### Originalarbeiten

Hebestreit P, Melzig MF. Cytotoxic activity of the seeds from *Agrostemma githago* L. *Planta med* 2003; 10: 921-5.

Hebestreit P, Melzig MF, Czygan FC. Die Kornrade, eine Blume besonderer Art. *Z Phytother* 2003; 24: 249-53.

Heisler I, Sutherland M, Bachran C, Hebestreit P, Schnitger A, Melzig MF, Fuchs H.. Combined application of saponin and immunotoxins drastically enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells. *J Control Rel* (eingereicht).

### Diplomarbeit

Untersuchungen zur Toxizität von *Agrostemma githago* L. (Berlin, Greifswald 1999)

### Vorträge

*Agrostemma githago* L.: Untersuchungen zur Toxizität  
Jahrestagung der DPhG/Landesgruppe Berlin, Juli 2001

*Agrostemma githago* L. Isolation of the toxic compounds and new approaches to their mode of action

International Congress and 50th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Barcelona 2002 September 8-12; SL19

## Poster & Abstracts

P. Hebestreit, M.F. Melzig: Cytotoxic Activity of the Seeds from *Agrostemma githago* L.: International Congress and 48th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA), ETH Zürich 2000, September 3-7, Poster P2A/37; 25th International LOF-Symposium (GA; FWO), Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussels 2001, Belgium February 16

P. Hebestreit, M.F. Melzig: *Agrostemma githago* L.: Further Studies on the Seeds Cytotoxic Activity: International Congress and 49th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Erlangen 2001, September 2-6, Poster 3.32

P. Hebestreit, M.F. Melzig: *Agrostemma githago* L. Isolation of the toxic compounds and new approaches to their mode of action: Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., 9.-12. Oktober 2002, Berlin, Poster B9

P. Hebestreit, J. Wegener, M.F. Melzig: Investigation of cell membrane integrity after saponin/ agrostin-treatment: International Congress and 51st Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Kiel 2003 August 31-September 4, Poster P201; Doktorandentagung der DPhG/ Landesgruppe Berlin, Juli 2004

P. Hebestreit, M.F. Melzig: Synergistic action of saponins with type I ribosome-inactivating proteins agrostin and saporin; GBM Münster 2004

## Lebenslauf

Johann Philipp Hebestreit

11. September 1972	geboren in Mannheim
1992	Abitur am Geschwister-Scholl-Gymnasium in Lüdenscheid
1992-1993	Zivildienst bei der Stadt Lüdenscheid (Gewässerschutz)
1993-1997	Pharmaziestudium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald
1997-1998	Studium an der University of Saskatchewan in Kanada
1999	Diplom an der Humboldt-Universität zu Berlin
1999-2000	Pharmaziepraktikant in der Schwanen-Apotheke, Berlin-Prenzlauer Berg
2000	Approbation als Apotheker
2000-2004	Promotion am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Biologie, Prof. Dr. M. F. Melzig
2004	Anstellung bei der BASF AG, Fine Chemicals Division/Regulatory Affairs

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. M. F. Melzig für die Überlassung des Themas und seine ausgezeichnete Unterstützung. Insbesondere möchte ich ihm für seine zahlreichen Anregungen und Hinweise sowie die Bereitschaft zur Diskussion bei der Bearbeitung des Themas danken.

Ich danke Frau Prof. M. A. Lacaille-Dubois, Université de Bourgogne und Herrn Dr. G. Bader für die zur Verfügung gestellten Saponine.

Herrn Dr. H. Fuchs und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe an der Charité, Campus Benjamin Franklin, danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und das große Interesse an der Weiterentwicklung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. J. Wegener bedanke ich mich für die ECIS-Untersuchungen, die am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster durchgeführt wurden.

Weiterhin möchte ich Frau I. Dobbrodt für die Einarbeitung im Zelllabor danken, sowie den Mitarbeitern des FMP für die FPLC-Untersuchungen an ihrem Institut.

Ich möchte auch der Bernbeck-Stiftung für die finanzielle Unterstützung von 2001-2003 herzlich danken.

Abschließend sei Frau I. Funke, Frau B. Rennert, Frau Dr. H. Major und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie der Humboldt-Universität und der Freien Universität Berlin für das freundliche Miteinander im Labor und ihre Hilfsbereitschaft Dank gesagt.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den

Philipp Hebestreit